



Etude des déterminants de la vulnérabilité à la cavitation du xylème chez les peupliers

Hosam Awad

► To cite this version:

Hosam Awad. Etude des déterminants de la vulnérabilité à la cavitation du xylème chez les peupliers. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2011. Français. NNT : 2011CLF22163 . tel-00678590

HAL Id: tel-00678590

<https://theses.hal.science/tel-00678590>

Submitted on 13 Mar 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Ecole Doctorale Des
Sciences de la Vie et de la Santé, Agronomie, Environnement**

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(Spécialité : Physiologie et Génétique moléculaires)

Soutenue le 23-09-2011

Hosam AWAD

**Etude des déterminants de la vulnérabilité à la cavitation
du xylème chez le peuplier**

Jury

Rapporteurs

Sylvain Delzon	Chargé de recherche, Université de Bordeaux
Philippe Rozenberg	Directeur de recherche, INRA, Orléans

Examineurs

Hervé Cochard	Directeur de recherche, INRA, Clermont-Ferrand (directeur de thèse)
Stéphane Herbette	Maître de conférences, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand
Roland Huc	Chargé de recherche, INRA, Avignon
Jean-Louis Julien	Professeur, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand

Résumé

Les modèles climatiques prédisent pour le futur une accentuation de la fréquence et de l'intensité des épisodes de sécheresse, ce qui affecterait sérieusement les écosystèmes forestiers. En conséquence, il y a une demande croissante pour du matériel végétal plus résistant à la sécheresse, et pour la compréhension des mécanismes génétiques et physiologiques de la tolérance des arbres à la sécheresse. Dans des conditions de sécheresse, la tension dans les vaisseaux du xylème augmente, et la cavitation peut se produire causant une embolie du vaisseau qui devient alors non fonctionnel. La vulnérabilité du xylème à la cavitation est corrélée à la tolérance à la sécheresse, indiquant l'importance de ce caractère pour la tolérance à la sécheresse. Cependant, peu était connu sur la variabilité de ce caractère au niveau intra-spécifique et ses bases génétiques étaient inconnues.

Dans un premier temps, nous avons démontré que la vulnérabilité à la cavitation du xylème de peuplier (*Populus tremula* x *Populus alba*) s'acclimate à des conditions de sol plus sec et que ceci s'accompagne de changements dans la structure du xylème et d'expressions géniques. Ce processus d'acclimatation appuie l'hypothèse du rôle important joué par la vulnérabilité du xylème à la cavitation dans la tolérance à la sécheresse.

Dans un second temps, nous avons étudié les bases structurales et génétiques de la vulnérabilité à la cavitation grâce à deux approches. La première a consisté à étudier les changements anatomiques et d'expressions géniques se produisant au cours de l'acclimatation de la vulnérabilité du xylème à la cavitation à des conditions plus sèches. Nous avons déterminé que l'augmentation de la vulnérabilité à la cavitation dans des conditions plus sèches est corrélée à une diminution du diamètre de la paroi de la ponctuation. Nous avons observé des changements d'expression géniques dans des conditions de sécheresse mais ceux-ci n'ont pas pu être reliés à un changement de la vulnérabilité à la cavitation. Dans une seconde approche, nous avons utilisé dix lignées de peupliers dont l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme de la lignine ont été modifiés et deux lignées surexprimant une pectine méthylestérase (PME) pour examiner le rôle de ces gènes dans la vulnérabilité à la cavitation. Chez les peupliers ayant un métabolisme des lignines modifié, nous avons également testé la relation entre les propriétés hydriques et mécaniques. Nous apportons des preuves que les lignines et les pectines (à travers les PME) sont impliquées dans la vulnérabilité à la cavitation et nos données sur les lignées transgéniques de peupliers ne soutiennent pas un lien exclusif entre les propriétés hydriques et mécaniques.

Abstract

Climatic models predict greater frequency and intensity of drought episodes in the future that would seriously affected forest ecosystems. As a consequence, there has been a rising demand for more drought-resistant plant materials and for the understanding of the physiological and genetic bases of tree drought tolerance. Under drought conditions, the tension in the xylem conduits increases and cavitation can occur that causes embolism and makes the vessel non functional. Xylem vulnerability to cavitation is correlated with drought tolerance, pointing that it's an important trait for drought tolerance of trees. However, few was known about the variability of this trait at the within species level and its genetic bases were unknown.

In a first part, we demonstrated that the xylem vulnerability to cavitation of poplar (*Populus tremula* × *Populus alba*) acclimated to drier soil conditions, and was accompanied with changes in xylem structure and gene expressions. This acclimation process supports the role of vulnerability to cavitation in drought tolerance.

In a second part, we investigated the structural and genetic bases for vulnerability to cavitation through two approaches. In a first one, we investigated the anatomical changes and the gene expressions that occur during the acclimation of vulnerability to cavitation to drier conditions. We found that the increase in vulnerability to cavitation in drier soil conditions was related to a decrease in pit wall diameter. We observed changes in gene expressions in drier conditions but these changes could not be related to change in vulnerability to cavitation. In a second approach, we used ten transgenic poplar lines modified for expression of genes involved in lignin metabolism and two transgenic lines overexpressing a pectin methylesterase (PME) to examine the role of the respective genes in the vulnerability to cavitation. In poplars modified in lignin metabolism, we also tested the relation between hydraulic and mechanical properties. We present evidence that lignins and pectins (through PME) are involved in the vulnerability to cavitation and our data on the transgenic poplar lines do not support the exclusive link between mechanical vs. hydraulic properties.

Remerciements

Me voilà et enfin après 4 ans ; me voila en train d'écrire mes remerciements. Je n'y crois pas ; pincer moi c'est un rêve ou une réalité ?.....

NON !! C'EST LA REALITE !!!!

C'EST GENIAL !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

C'EST COOLL !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

HAHAHAHAHAHAHAHAHAHAHA !!!!!! (☺)

En premier lieu, je tiens à remercier Mr. Philippe Rozenberg, et Mr. Sylvain Delzon, de me faire l'honneur de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. J'adresse également mes remerciements à Mr. Roland Huc d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier Mr. Hervé Cochard pour m'avoir proposé ce sujet de recherche. Je le remercie de sa confiance.

Je remercie Mr. Jean-Louis Julien pour m'avoir accueilli au sein de l'UMR PIAF. Quand je suis arrivé le premier jour au PIAF, c'est sans doute la personne qui m'a le plus marqué (sa voix me rappelle les acteurs de cinéma Français de l'ancien temps). Je pense Jean-Louis, que mon départ sera reposant pour toi car tu n'aura plus à envoyer des centaines de courriers à l'ambassade d'Egypte qui demande toute les 2 secondes une lettre administrative.

Un grand merci à Stéphane Herbette, merci de m'avoir fait confiance, merci pour ta disponibilité, tes conseils scientifiques, ton écoute et d'avoir pris le temps de venir à la paillasse. Nous avons réussi à réaliser un travail dont je suis fier. Je me souviendrai toujours de deux choses. Tout d'abord, la fois où on est partis au Puy de Dôme (la montée a été des plus difficiles, après mes 4 chutes et beaucoup de fatigue, je crois que c'est la première fois de ta vie que tu as mis 2 heures pour arriver au sommet). Je garderai un très bon souvenir de nos sorties en forêt pour la collecte des échantillons, surtout les jours de neige. Je n'oublierai jamais la fois où le 4X4 d'Hervé s'est embourbé dans la neige, heureusement que tu as pu trouver le tracteur pour nous sortir de là.

Et maintenant je m'attaque au PIAF, je remercie bien évidemment tous les membres du PIAF. Merci pour votre bonne humeur !!

Dans le film de Kevin Costner « Danse avec les loups », chaque indien avait un surnom, voici vos surnoms tels que moi je les imaginerais dans le film « Danse avec le PIAF » :

Agnès: « Forte voix », il y a du café, du thé, de l'eau chaude.....

Anaïs: « Aide dynamique »

Aude: « Fille aux 1000 volts »

Aurélie: « Glamour démarche »

Boris: « Humoristique man »

Brigitte: « Notre secrétaire bien aimée »

Catherine: « L'artiste »

Christelle: « Princesse in vitro »

David: « Disque dur du labo »

Delphine: « Organisatrice de charme »

Jean-Stephane: « L'homme de la gare » la toute première personne que j'ai vue du PIAF à la gare SNCF.

Jérôme: « Micropipette ambulante »

Marine: « Fille discrète »

Mélanie: « Calme comme la nuit »

Nathalie: « Femme active », 2 thèses en si peu de temps bravo !

Nicole: « Douce comme l'air »

Patricia: « Charme au naturel »

Sylvaine: « Coeur bon »

Valérie: « Clair comme le ciel »

Je voudrais remercier aussi les membres du PIAF de l'INRA, Eric BADEL, Têtè BARIGAH, Christian BODET, Pierre CONCHON et Rémi WORTEMANN pour leur aide technique surtout concernant le CAVITRON et leurs conseils.

J'adresse également un grand merci à tous mes amis, Wassim, Khaoula, Senda, Imen, Dalila, Aicha, Shaymaa, Jing, Ahmad, Ihab, Iman, Hatem, Aymen, Riham et Amr qui ont été toujours là pour moi dans les bons comme dans les mauvais moments.

Certes, cette expérience est sans doute la plus enrichissante que j'ai jamais vécu mais il est toujours difficile d'être loin de son pays. Chaque personne que je citerai dans ce paragraphe m'a donné une énergie, et l'ensemble de ses énergies, toujours positives, m'a permis d'atteindre mon objectif.

Mohammad Ahmed AWAD

Merci Papa, pour tes conseils avisés, ta détermination, ta motivation qui m'ont toujours boosté, j'espère avoir pu réaliser ton rêve.

Safaa Hamad

Merci Maman, pour tes prières, ta douceur, et ton incontournable soutien.

Rasha

Merci ma très chère femme, je n'arrive pas à trouver les mots pour dire à quel point tu as été pour moi un soutien sans faille. Il y a eu des moments difficiles que sans toi je n'aurais pu surmonter, sans ton amour incontournable et ta présence, je n'aurais jamais pu en arriver où j'en suis aujourd'hui. J'espère que ton accouchement se passera bien et j'attends avec impatience notre petit ***Abdel Rahman***.

Yousef

Merci mon chéri, merci pour ton sourire qui illumine ma vie. Tu es le soleil de ma vie, et j'espère que tu seras toujours fier de ton papa.

Hassnaa et Marwa

Merci mes sœurs adorées, merci pour tous les moments de joie; je serais toujours à vos côtés.

Stéphane Herbette

Beaucoup de personnes vont être étonnées que je cite Stéphane dans cette partie de mes remerciements qui est pourtant très personnelle ; je ne connaissais pas le sentiment d'avoir un grand frère. Quand je suis venu pour la première fois en France, je me sentais très seul, Stéphane n'est pas seulement mon encadreur, son soutien moral a été d'une grande importance pour moi. Sans son soutien je n'aurais jamais pu atteindre mon objectif.

ABBREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique.

ADNc : ADN complémentaire.

ARN: acide ribonucléique.

b : diamètre de la lumière du vaisseau.

CAD : alcool cinnamylique déshydrogénase.

CCR : cinnamoyl-CoA réductase.

COMT : acide caféique/acide 5-hydroxyfêrulique 3-O-méthyltransférase.

HGA : homogalacturonane.

K_h : conductivité hydraulique.

K_i : conductance initial.

K_{max} : conductance maximal.

P : pression xylémienne.

P12 : pression du xylème induisant 12% de perte de conductance.

P50 : pression du xylème induisant 50% de perte de conductance.

P88 : pression du xylème induisant 88% de perte de conductance.

PCRq : réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative en temps réel (q).

PG : polygalacturonase.

PLC : pourcentage de perte de conductance.

PME : pectine méthylestérase.

RGI : rhamnogalacturonane de type I.

RGII : rhamnogalacturonane de type II.

s : pente de la courbe de vulnérabilité au niveau de P50.

t : épaisseur de la paroi entre 2 vaisseaux.

TEM : microscopie électronique à transmission.

UGDH : UDP-glucose dehydrogenase.

XYL : xylan 1,4- β -xylosidase.

Ψ : potentiel hydrique.

Sommaire

Introduction générale	1
Synthèse bibliographique	3
I- Structure et composition du xylème.	4
I.1 Présentation générale du xylème.	4
I.2 Les vaisseaux du xylème.	4
I.3 Les ponctuations des vaisseaux.	5
I.4 La structure et la composition des parois.....	6
I.4.1 La lamelle moyenne.	6
I.4.2 La paroi primaire.....	7
I.4.3 La paroi secondaire.	7
I.4.4 Composants des parois.....	8
I.4.4.1 La cellulose.	9
I.4.4.2 Les hémicelluloses.	9
I.4.4.3 Les pectines.....	11
a) Les homogalacturonanes.	11
b) Les rhamnogalacturonanes-I.....	13
c) Les rhamnogalacturonanes-II.....	14
I.4.4.4 Les lignines.	14
I.4.4.5 Les protéines pariétales.....	16
II- Fonctionnement hydraulique.....	17
II.1 Les voies de circulation de l'eau.	17
II.2 les résistances au flux de sève.	18
II.3 La théorie de tension-cohésion.....	18
II.4 L'architecture hydraulique.	20
III- La cavitation du xylème.....	22
III.1 Mécanismes de la cavitation.	22
III.2 Résorption de l'embolie.....	25
III.3 Résistance à la cavitation	26
III.3.1 Sécheresse et résistance à la cavitation	26
III.3.2 Variabilité de la résistance à la cavitation.....	27
III.3.2.1 Variabilité inter-spécifique.....	27
III.3.2.2 Variabilité intra-spécifique.....	27
III.3.2.2.1 Variabilité génétique.	28
III.3.2.2.2 Plasticité phénotypique.	28
III.3.2.2.3 Variabilité entre organes.	29
III.4 Les méthodes de mesure	30
III.4.1 Mesure du taux d'embolie.....	30
III.4.2 Mesure de la résistance à la cavitation.	30
V Compromis entre la résistance à la cavitation et d'autres propriétés du bois.....	32
V.1 Compromis entre résistance à la cavitation et d'autres propriétés hydriques.	32
V.2 Compromis entre résistance à la cavitation et les propriétés du bois.	33
VI Le Peuplier.	34
VI.1 Biologie et écologie.	34
VI.2 Intérêt économique.....	35
VI.3 Intérêt scientifique.....	36
Objectifs	37
Chapitre 1 :	40
Acclimatation de la vulnérabilité à la cavitation au régime hydrique et.....	40
modifications des propriétés structurelles et d'expression géniques du	40

xylème	40
Résultats supplémentaires	51
Chapitre 2 :	61
Relation entre vulnérabilité à la cavitation et propriétés mécaniques chez.....	61
des peupliers transgéniques modifiées pour le métabolisme des lignines	61
Chapitre 3 :	86
Vulnérabilité à la cavitation de peupliers transgéniques surexprimant une pectine	
méthylesterase	86
Discussion générale et perspectives	103
Références	115
Annexe	137

Introduction générale

Le contexte du changement climatique génère des interrogations sur les capacités d'acclimatation et d'adaptation des espèces longévives comme les arbres, notamment face aux sécheresses extrêmes. En effet, des modèles des aires répartition des espèces prédisent des modifications de ces aires de répartition en lien avec les changements climatiques. Ces modèles reposent essentiellement sur des données climatiques et ils sont très incertains car ils ne prennent pas en compte l'écophysiologie des espèces puisqu'elle est encore insuffisamment caractérisée. Ces interrogations liées au manque d'information sur l'écophysiologie des espèces ont conduit l'équipe HYDRO, au sein de laquelle s'est réalisée cette thèse, à identifier les bases physiologiques et moléculaires du fonctionnement hydraulique des arbres en lien avec leur résistance à la sécheresse.

La transpiration est la force motrice de la circulation de la sève ; et selon la théorie de la « tension-cohésion », ce flux de sève se fait du sol vers les feuilles le long d'un continuum de potentiels hydriques décroissants. Ainsi, la pression dans les conduits du xylème peut être très négative (typiquement dans -1 à -3 MPa) et place la sève dans un état physique métastable. Lors d'une sécheresse, cette tension est exacerbée et, si elle dépasse une valeur seuil, la colonne d'eau se rompt (le phénomène est appelé cavitation). Les conduits remplis de gaz deviennent alors embolisés et non fonctionnels. Une forte corrélation existe entre la vulnérabilité à la cavitation et la tolérance des arbres à la sécheresse. Dans la littérature, la vulnérabilité à la cavitation est alors admise comme un caractère déterminant de la tolérance des arbres à une sécheresse extrême. Cette relation a suscité l'intérêt d'identifier les facteurs environnementaux et génétiques contrôlant la vulnérabilité à la cavitation. Au commencement de la thèse, les informations sur la variabilité de ce caractère à l'échelle intra-spécifique étaient insuffisantes et les bases moléculaires et génétiques étaient inconnues. L'objectif de ma thèse était d'analyser la variabilité de ce caractère chez le peuplier et d'identifier des gènes importants pour le contrôle de ce caractère.

La première partie de ce manuscrit est une revue de la littérature visant à présenter la structure et la composition biochimique du xylème, les principaux concepts utiles à la compréhension du fonctionnement hydraulique de l'arbre, et l'état des connaissances sur la vulnérabilité à la cavitation. A l'issue de cette synthèse bibliographique, nous présentons les objectifs de cette thèse visant à combler les manques de connaissance sur les déterminants physiologiques et moléculaires de la vulnérabilité à la cavitation. Les résultats du travail de thèse sont présentés sous la forme de trois chapitres organisés sous forme d'articles. Ils seront ensuite discutés au regard des objectifs initiaux fixés.

Synthèse bibliographique

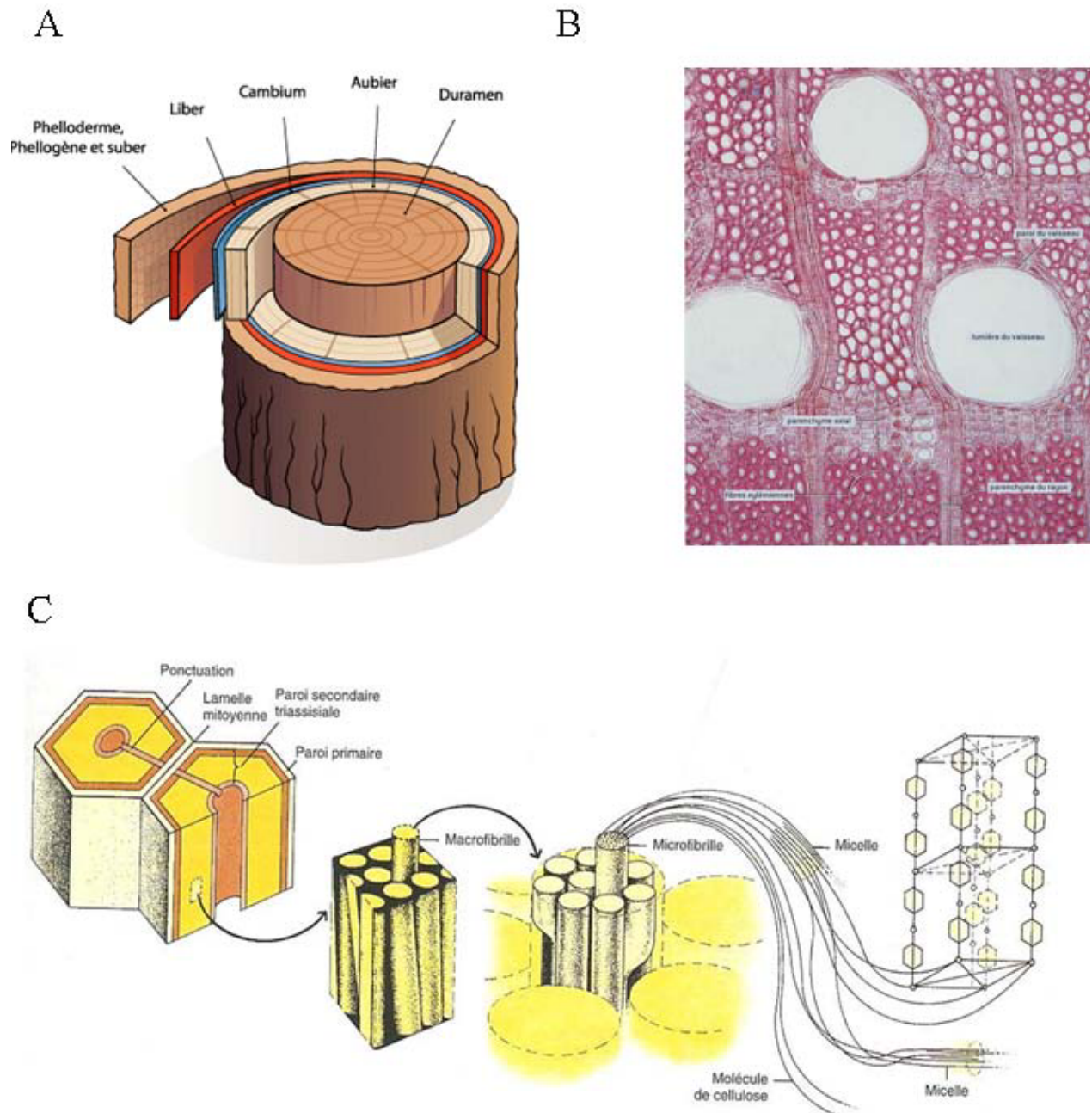


Fig. 1 : Les différentes échelles d'observation du bois d'angiospermes. A) Représentation des différents tissus dans un tronc d'arbre. Le xylème est présent sous 2 formes : l'aubier et le duramen. B) Coupe transversale de xylème de "*Fraxinus excelsior*" observée au microscope photonique (X 200). C) représentation schématique des niveaux d'organisation des parois.

I- Structure et composition du xylème.

I.1 Présentation générale du xylème.

Le xylème ou bois est un ensemble de tissus cellulaires, de consistance plus ou moins dure, formant la masse principale du tronc des arbres. C'est un matériau qui présente des tissus hétérogènes et organisés. Les bois des deux grands groupes d'arbres (angiospermes et gymnospermes) se distinguent très nettement à l'échelle microscopique. La structure du bois des conifères est plus simple et uniforme. Les mêmes cellules, les trachéides orientées verticalement, assurent le double rôle de conduction de la sève et de support mécanique. La structure des bois de feuillus (angiospermes) est plus complexe (figure 1). Le nombre d'éléments constitutifs est plus grand et leur agencement plus variable. Le bois est constitué de vaisseaux (rôle de conduction), de fibres ligneuses (rôle de soutien) et de cellules parenchymateuses. La figure 1 illustre d'une manière simple l'organisation du bois chez les angiospermes à différents niveaux d'observation : les tissus (fig.1A), les cellules (fig. 1B) comprenant les fibres, le parenchyme du rayon, le parenchyme axial, les vaisseaux, et la paroi cellulaire de ces cellules (fig. 1C).

I.2 Les vaisseaux du xylème.

Lors de la genèse des cellules par division, une couche mitoyenne de nature pectique se forme, puis les cellules sécrètent une paroi primaire pecto-cellulosique de part et d'autre de cette couche mitoyenne. Cette couche mitoyenne est aussi appelée lamelle moyenne. Par la suite, au cours de la différenciation de la cellule, apparaît la paroi secondaire.

Les vaisseaux du xylème sont constitués de cellules mortes (Fig. 2), allongées verticalement et de longueur variable. Ces cellules sont perforées aux extrémités et accolées les unes aux autres en longues files longitudinales, formant ainsi les vaisseaux. Le xylème secondaire des angiospermes peut contenir les deux types d'éléments conducteurs : les trachéides et les vaisseaux, alors que les conifères ne possèdent que des trachéides. La longueur de vaisseaux varie suivant les espèces. Les vaisseaux des lianes sont ceux ayant les plus grands diamètres et les vaisseaux les plus longs, jusqu'à 8 m de long (Ewers, 1985). Dans les bois à pores diffus les plus longs vaisseaux atteignent environ 1m de long, mais la plupart sont beaucoup plus courts avec le plus grand pourcentage inférieur à 10 cm de long (Zimmermann, 1983). Le diamètre des vaisseaux varie aussi suivant les espèces et il varie de moins de 20µm à plus de 200µm. Chez les espèces de peupliers, la longueur des vaisseaux est parfois supérieure à 30 cm, et leur diamètre est compris entre 20µm et 50µm. Si de grands

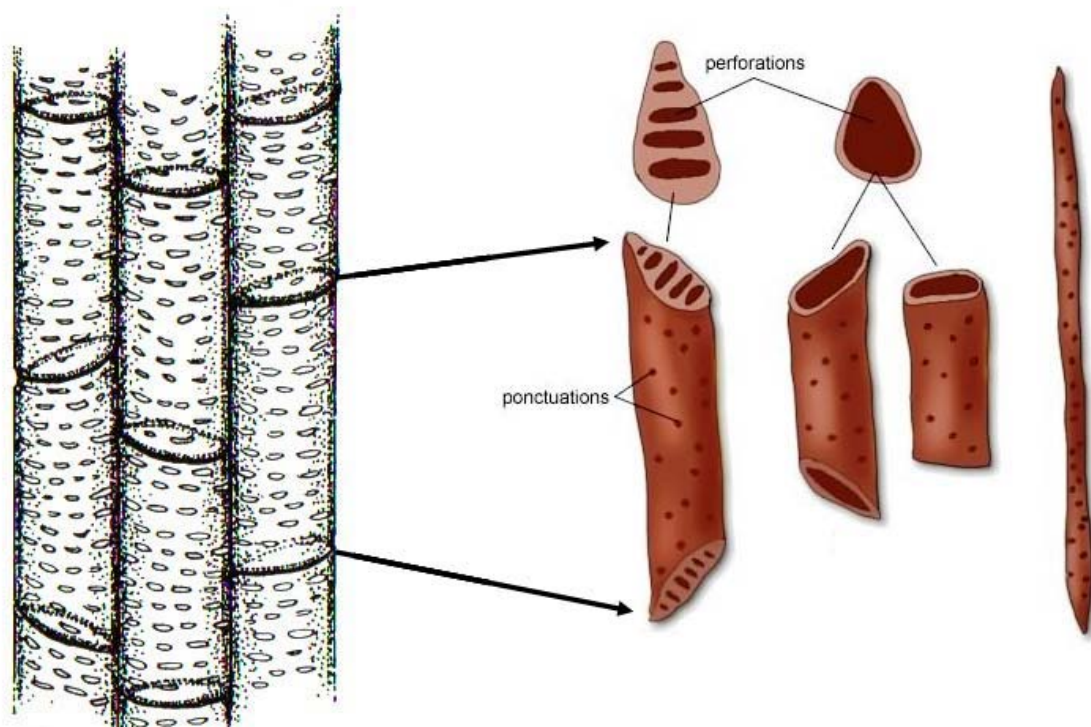


Fig. 2 : Modèle structural des vaisseaux du xylème. Les vaisseaux (à gauche) sont constitués par des éléments des vaisseaux (à droite) communiquant entre eux par les plaques de perforation. Quant aux vaisseaux, ils communiquent entre eux par les ponctuations.

vaisseaux ne sont formés qu'au printemps, ils ont une disposition annulaire : ce bois est dit annelé ou à anneaux poreux, comme chez le chêne, le frêne ou l'orme. Lorsque ces vaisseaux sont formés tout au long de la période de végétation, ils sont alors répartis plus ou moins régulièrement sur toute la surface de la coupe transversale, et nous parlerons alors de bois à pores diffus, comme chez le bouleau, le hêtre ou le peuplier.

Dans certains cas, la lumière des vaisseaux peut s'obstruer par des excroissances des cellules de parenchyme ligneux (thylles). Elle peut aussi se boucher par le dépôt de tanins et d'autres substances. Ces dernières sont souvent déposées dans les parois des cellules et les protègent contre les attaques microbiennes. Il en résulte généralement une coloration sombre qui permet de bien distinguer le bois de cœur sombre, de l'aubier qui est plus clair. Cette imprégnation du bois améliore aussi ses caractéristiques mécaniques telles que sa dureté. Cette formation de bois de cœur ne se réalise pas toujours ou n'est pas toujours aussi discernable de l'aubier. Ainsi le tilleul et le saule en sont dépourvus.

I.3 Les ponctuations des vaisseaux.

Les parois de vaisseaux sont épaisses et lignifiées et comportent de nombreuses ponctuations (Fig. 2). Le rôle principal des ponctuations est de faciliter le passage de l'eau entre les vaisseaux. Il est reconnu depuis longtemps que les parois des ponctuations jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité du système de transport de l'eau dans les plantes (Zimmermann and Brown, 1971). Tout en permettant le passage de l'eau entre les vaisseaux du xylème, la paroi des ponctuations doit aussi protéger la plante contre la propagation de bulles de gaz (responsable d'embolie) ou d'agents pathogènes dans le système vasculaire (Tyree and Sperry, 1989; Choat et al., 2008). Les ponctuations entre vaisseaux du xylème sont constituées d'une paroi primaire ayant subi des modifications, et elles ne présentent pas de paroi secondaire (Fig. 3). Leur diamètre varie de 0.1 à 10 μm suivant les espèces (Siau, 1984 ; Sperry et Tyree 1988). La ponctuation aréolée est un type particulier. La paroi de la ponctuation (formée par la lamelle moyenne et les parois primaires des deux cellules contiguës) est bordée sur ses deux faces au contact de cellules lignifiées ou sur une seule au contact de cellules vivantes, par la paroi cellulaire décollée et soulevée, percée en son sommet d'un petit pore central. Ce décollement circulaire forme une aréole autour du pore. Chez la plupart des gymnospermes et chez quelques angiospermes, la partie centrale de la paroi est épaissie en un torus, tandis que sa partie marginale reste fine, formant ce qu'on appelle le diaphragme ou la marge (Fig. 3). Dans quelques cas, comme chez les Pinacées, le diaphragme

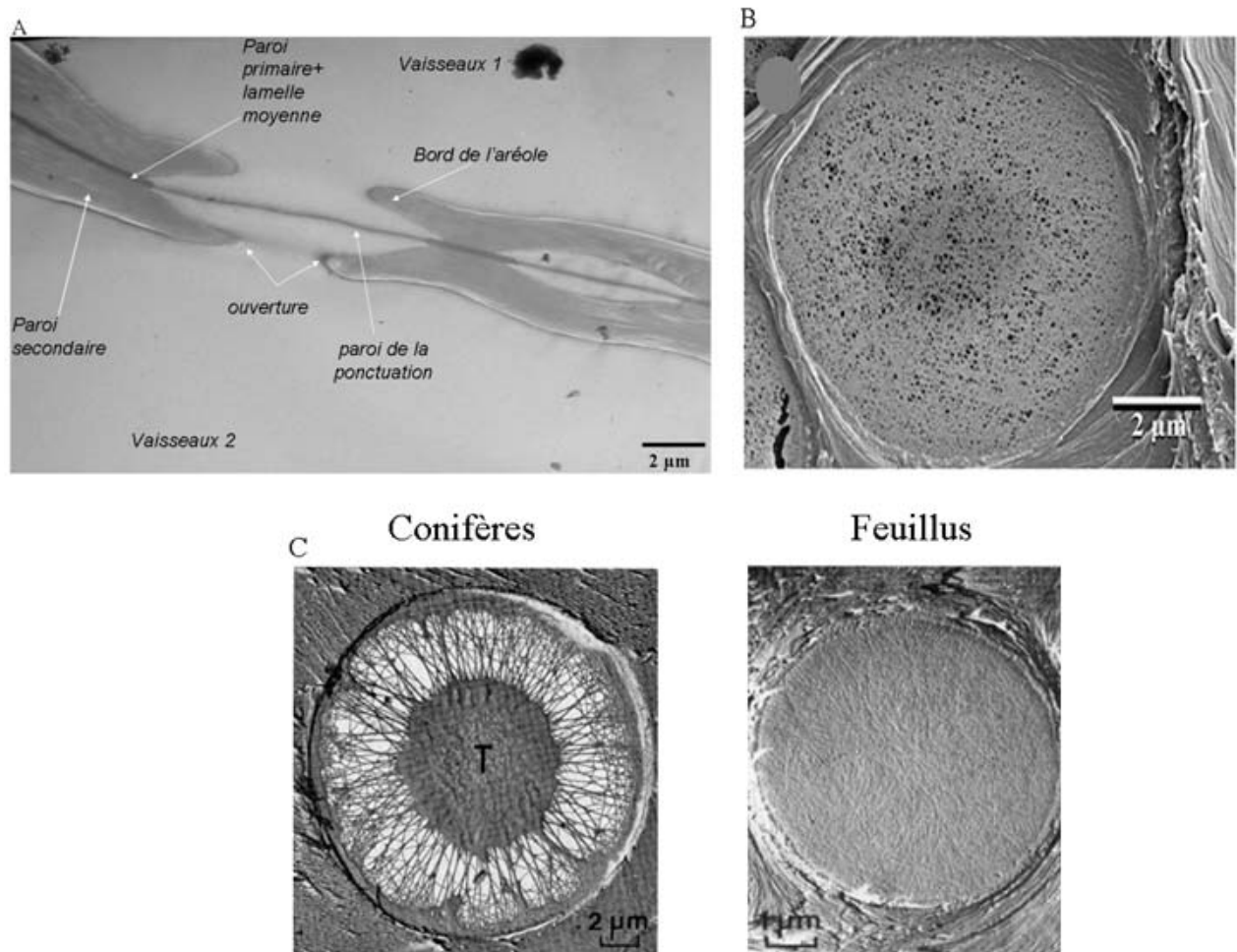


Fig. 3 : Structures de ponctuations observées en microscopie électronique. A) Photo de microscopie électronique à transmission d'une coupe transversale de xylème de peuplier montrant une ponctuation entre deux vaisseaux. B) photo de microscopie électronique à balayage montrant une ponctuation du bois de peuplier (*Populus tremula* x *alba*). C) photo de microscopie électronique à balayage montrant les 2 types de ponctuations : celui des conifères et celui des angiospermes.

n'est formé que de faisceaux de microfibrilles cellulosiques qui relient dans une direction essentiellement radiale, le torus au bord du décollement. La totalité du matériel pariétal non cellulósique de la lamelle moyenne et des deux parois primaires est dissoute dans ce cas. Le passage de l'eau est ainsi grandement facilité. Généralement, plus le diamètre et la longueur des trachéides et des vaisseaux sont grands, plus le nombre de ponctuations est élevé. Cela dit, le nombre et la taille de ces ponctuations constituent des irrégularités qui affaiblissent la structure des trachéides et des vaisseaux. Sirviö et Kärenlampi (1998) ont montré que la taille et la densité des ponctuations augmentent également aux alentours des extrémités effilées des trachéides. Cela explique la vulnérabilité des fibres de bois dans ces endroits.

Les premières études sur les ponctuations ont souligné les différences entre l'ultrastructure des ponctuations de différentes espèces, et elles ont indiqué le peu de variation entre les ponctuations au sein d'une espèce (Schmid, 1965; Schmid et Machado, 1968; Yang, 1978). Jansen et al. (2009) ont utilisé la microscopie électronique à balayage et la microscopie électronique à transmission, pour examiner les variations structurelles des ponctuations dans 26 espèces de feuillus. Les variations de la structure des ponctuations entre 6 espèces sont montrées sur la figure 4. Le diamètre moyen des ponctuations varie de 2.1 μm (*Betula ermanii*) à 7.6 μm (*Populus fermentii*). Ils ont également noté une variation au niveau de l'épaisseur de la paroi des ponctuations, avec la paroi de la ponctuation d'*Acacia pataczekii* qui a une épaisseur moyenne de 1183 (\pm 442) nm, alors que celle de *Salix alba* a une épaisseur moyenne de 70 (\pm 15) nm.

I.4 La structure et la composition des parois.

I.4.1 La lamelle moyenne.

La lamelle moyenne (ou lamelle mitoyenne) est constituée en grande partie de substances pectiques, macromolécules de nature glucidique composées essentiellement d'acide galacturonique (polysaccharides acides) et d'eau. Dans le xylème, au cours de la différenciation des cellules, cette lamelle moyenne est imprégnée de lignine. C'est une paroi hydrophile qui enveloppe les cellules et dont les propriétés physico-chimiques conditionnent la cohésion des cellules contiguës. Cette paroi est mise en place entre 2 cellules non différenciées et en cours de croissance.

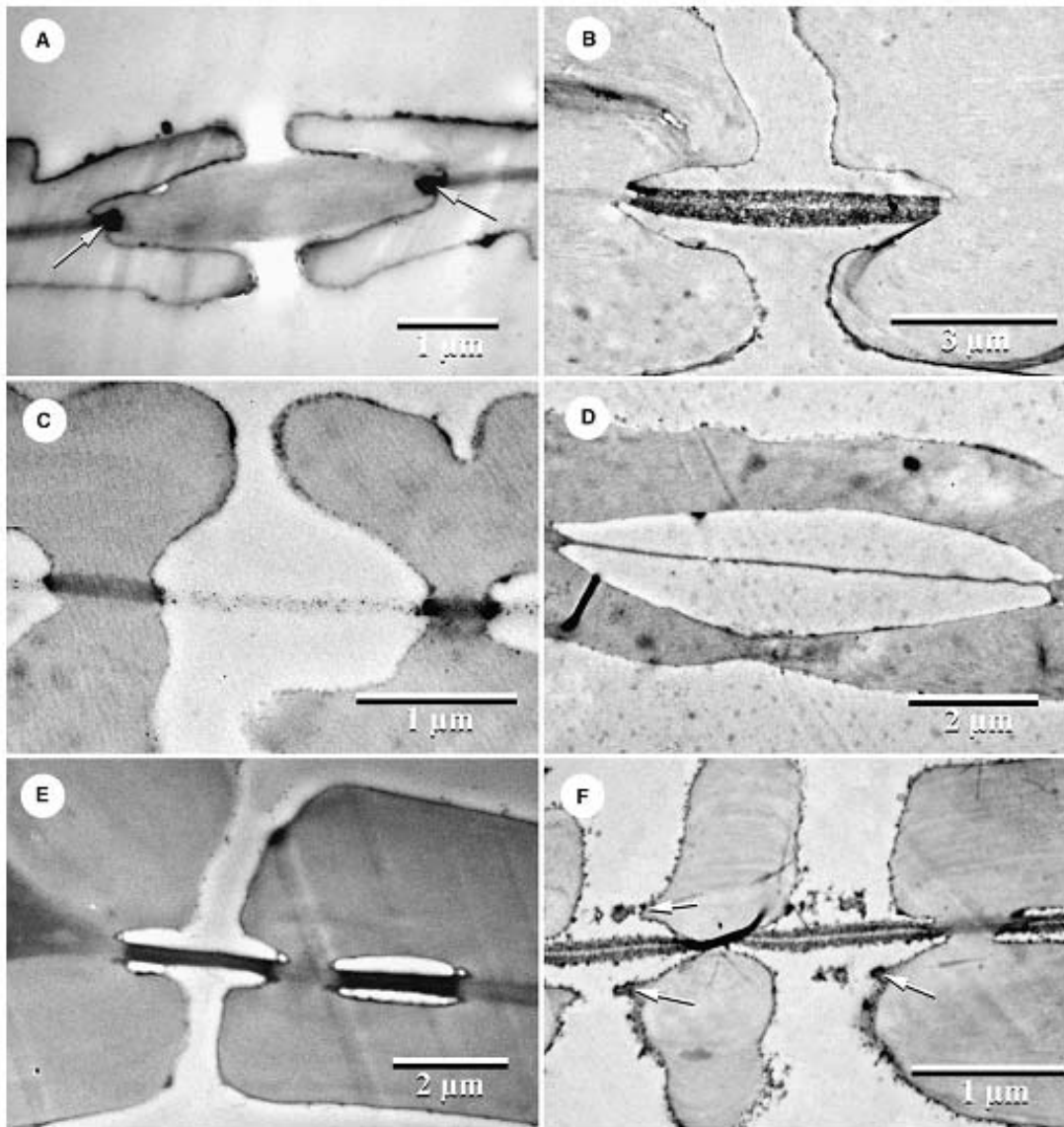


Fig. 4 : Photos de microscopie électronique à transmission montrant la variation structurelle des ponctuations entre 6 espèces (Jansen et al., 2009). (A) *Arbutus uva-ursii*, (B) *Laurus nobilis*, (C) *Betula ermanii*, (D) *Populus fremontii*, (E) *Citrus reticulata*, (F) *Fraxinus americana*.

I.4.2 La paroi primaire.

La paroi primaire est formée par des cellules en croissance. Elle est généralement considérée comme relativement peu spécialisée et similaire dans l'architecture moléculaire à tous les types de cellules. La paroi primaire est souple et extensible, avec 75 à 80%, d'eau, ce qui permet l'élongation cellulaire. Son épaisseur est très faible ($\sim 0.1 \mu\text{m}$). Sa synthèse est initiée au niveau du phragmoplaste lors de la cytokinèse (Dickison, 2000). Les parois primaires sont composées de quantités équivalentes de celluloses, d'hémicelluloses et de pectines (Fig. 5). Cette paroi contient aussi 1 à 5% de protéines structurales très diversifiées. Parmi ces protéines, on retrouve les extensines, les arabinogalactanes, les glycoprotéines riches en hydroxyproline et les protéines riches en glycine ou en proline.

I.4.3 La paroi secondaire.

La paroi secondaire se forme à la fin du processus d'élongation cellulaire de la paroi primaire. Les parois secondaires sont composées de cellulose, d'hémicelluloses, de lignines et de protéines (Fig. 6A). La paroi secondaire représente environ 60% de la paroi cellulaire ; elle est moins riche en eau que la paroi primaire. Elle est constituée de trois sous-couches S1, S2 et S3, (Fig. 6B) que l'on peut distinguer grâce à l'orientation différente que prennent les microfibrilles de cellulose dans ces sous-couches. La couche S1 a des microfibrilles de cellulose disposées en hélice et d'orientation variable et alternée, mais dont l'angle atteint dans la zone la plus interne 60 à 80° par rapport à l'axe de la cellule. Son épaisseur varie de 0.1 à $0.35 \mu\text{m}$ et elle représente 5 à 10% de l'épaisseur totale de la paroi cellulaire. Cette structure en réseau croisé expliquerait la forte résistance à la traction transversale de cette zone de la paroi cellulaire et serait aussi responsable du fait que les variations dimensionnelles en fonction de la perte ou de la fixation d'eau, se fassent dans S1 presque uniquement dans le sens longitudinal. La couche S2 constitue la partie la plus volumineuse de la paroi. Elle est formée d'une organisation de lamelles de microfibrilles de cellulose, en hélices parallèles dont l'angle dans le bois normal est compris entre 5 et 30° par rapport à l'axe de la cellule. L'épaisseur de la paroi S2 varie de 1 à $10 \mu\text{m}$; elle représente 75 à 85% de l'épaisseur totale de la paroi cellulaire. L'orientation de la matière dans la paroi S2, et l'importance de cette couche qui forme la masse essentielle de la cellule, sont largement responsables du comportement physique de la paroi cellulaire de la cellule. La couche S3 présente des microfibrilles strictement moins parallèles entre elles que dans S2. L'orientation générale ferait ressortir un angle des microfibrilles par rapport à l'axe de la cellule d'environ 60 à 90° ,

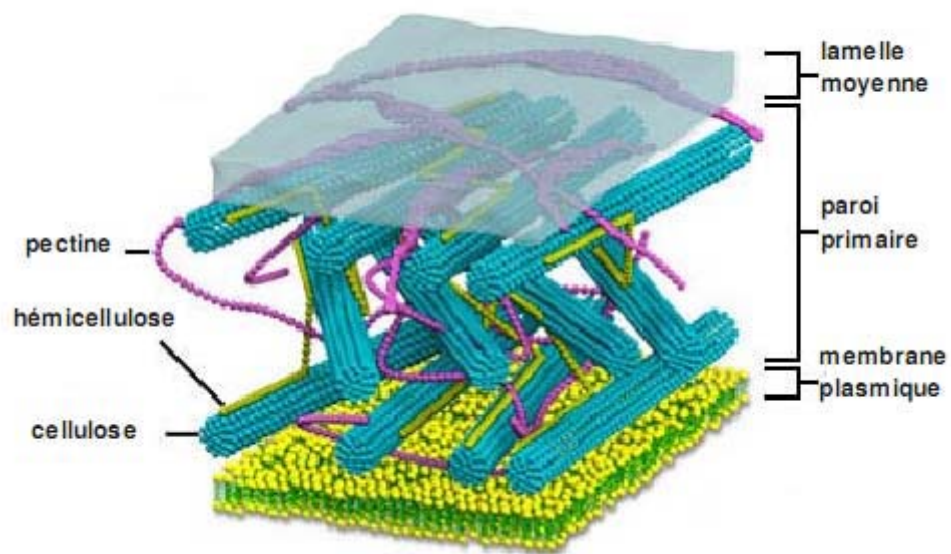


Fig. 5 : Modèle simplifié de la paroi primaire. Les microfibrilles de cellulose interagissent avec les hémicelluloses et les pectines forment une matrice occupant le reste de l'espace. La zone de contact entre deux cellules est appelée lamelle moyenne et elle est de nature pectique.

mais il semble que diverses configurations existent. La couche interne est relativement mince, son épaisseur est de l'ordre de 0.5 à 1.1 μm (Fig. 6B). La cellulose et les hémicelluloses y apparaissent néanmoins mieux organisées structurellement que dans la paroi primaire. Les parois secondaires sont organisées de façon hélicoïdale ce que Reis et Vain (2004) expliquent au travers d'une interaction avec les xylanes. En effet, dans la paroi secondaire, il existe une étroite corrélation entre la présence des glucuronoxylanes et l'apparition d'une organisation hélicoïdale. De plus, à la surface des microfibrilles de cellulose, des acides sont directement pontés suggérant que les microfibrilles sont co-cristallisées avec les glucuronoxylanes et induisent l'arrangement hélicoïdal des microfibrilles. Plusieurs études ont montré que la structure des xylanes était elle-même hélicoïdale par diffraction des rayons X ou par calculs théoriques. Dans le cas du xylane natif (c'est-à-dire sans aucune substitution), les hélices les plus stables sont des hélices droites en considérant au départ qu'elles contenaient 2 à 6 résidus par tour d'hélice (Mazeau et al., 2005). Les arabinoxylanes possèderaient quant à eux une conformation semi-flexible. Dans ce cas, la substitution de la chaîne de xylose par de l'arabinose n'aurait pas d'influence sur la conformation et les propriétés macromoléculaires des arabinoxylanes (Dervilly-Pinel et al., 2001). La présence de chaînes latérales d'arabinose induit cependant une contrainte stérique qui oriente la conformation vers une organisation de type "three-fold helical" (Yui et al., 1995). Son rôle est primordial dans le cas de cellules spécialisées qui assurent, entre autres des fonctions de coordination ou de maintien. La paroi secondaire est sujette à de nombreuses contraintes telles que la tension ou la compression. Elle possède aussi de nombreuses fonctions parmi lesquelles l'adhésion cellulaire, la régulation de la croissance et un effet barrière contre les pathogènes.

I.4.4 Composants des parois.

La première classification chimique des substances constituant le bois et les autres espèces végétales se fait par leur masse molaire (Fengel et Wegener 1984). On trouve ainsi des substances de masse molaire élevée telles que la cellulose, les hémicelluloses, les pectines et les lignines. Des substances de faible masse molaire comme les substances organiques extractibles, et les inorganiques généralement classées comme cendre car leur dosage se fait par pyrolyse complète du bois. Les substances macromoléculaires sont clairement majoritaires dans ces matériaux. Elles constituent 90% de la masse du bois chez les essences tropicales, et plus de 97% chez les arbres des zones tempérées (Fengel et Wegener 1984). De plus, la distribution de la matière vivante entre les végétaux et les animaux étant largement favorable

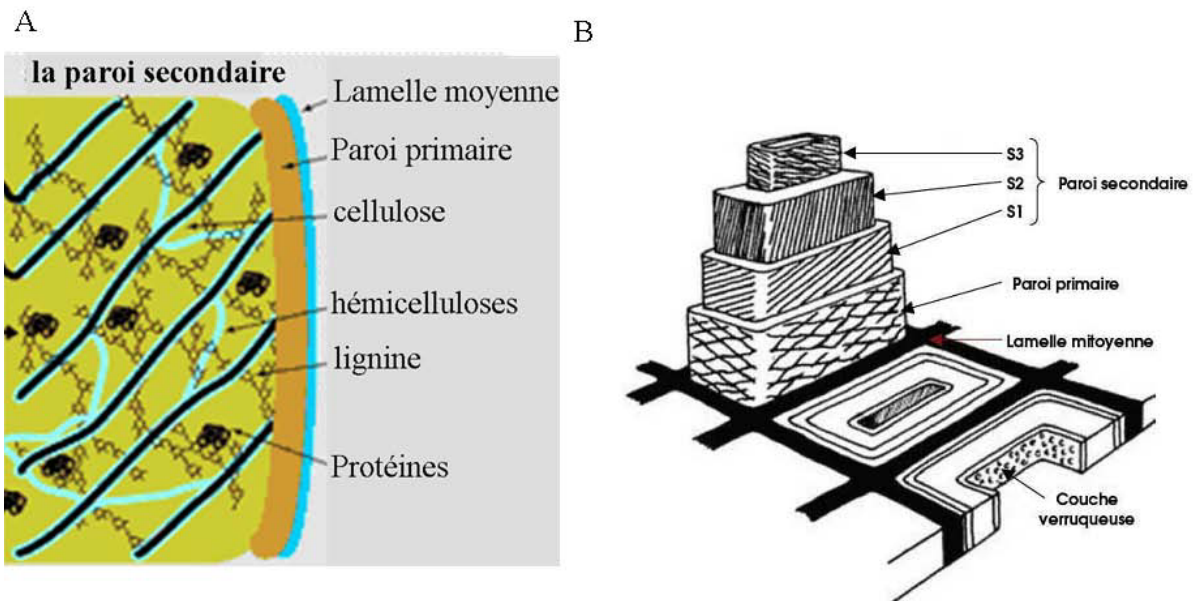


Fig. 6 : Modèle simplifié de la paroi secondaire. A) La paroi secondaire est composée de cellulose, d'hémicelluloses, de lignines et de protéines. Les parois secondaires peuvent devenir hautement spécialisées dans la structure et la composition, reflétant l'état différencié de la cellule. B) Représentation schématique des différentes assises pariétales. Les trois sous-couches S1, S2 et S3 de la paroi secondaire présentent des orientations différentes des microfibrilles de cellulose.

aux premiers (99%), ces composants macromoléculaires constituent le quasi totalité du carbone (96%) présent dans la matière organique vivante.

I.4.4.1 La cellulose.

La cellulose existe dans la paroi primaire et la paroi secondaire. La quantité de cellulose du bois varie de 40% à 50% (Fengel et Wegener 2003). La cellulose est un polymère comportant 500 à 14000 résidus de $\beta(1,4)$ -D-glucopyranose (Somerville, 2006). Deux de ces monomères disposés alternativement sont liés par leurs groupements hydroxyles des carbones C1 et C4 du cycle pyranose et forment des unités de cellobiose. Il en résulte une chaîne linéaire d'unités de cellobiose reliées par des liaisons glycosidiques formant le polymère de cellulose. Les chaînes de cellulose des parois végétales sont synthétisées dans l'apoplaste par la cellulose synthase localisée au niveau de la membrane plasmique. Les chaînes de cellulose de la paroi primaire sont de faible poids moléculaire par rapport à la cellulose des chaînes de la paroi secondaire (Brown, 2004 ; Brett, 2000). La cellulose constitue la trame principale de la paroi cellulaire. L'existence de liaisons inter- et intra-chaînes permet une accumulation linéaire de fibres de cellulose, formant un réseau cristallin au sein de la paroi cellulaire (Delmer et Amor, 1995), comprenant des douzaines de chaînes de polymère, qui font 3 à 5 nm de largeur et plusieurs μm de longueur (Cosgrove, 2005, Fig. 7). Les chaînes de cellulose sont associées étroitement grâce à un réseau étendu de liaisons hydrogène formant ainsi les microfibrilles qui sont les principaux éléments structuraux de la paroi cellulaire. Lors de sa formation, la cellulose cristallise partiellement. Le reste des chaînes, moins ordonné, forme la cellulose amorphe. Les microfibrilles sont liées par de nombreuses liaisons hydrogène à d'autres composés cristallins et amorphes.

I.4.4.2 Les hémicelluloses.

Les hémicelluloses sont des polysaccharides flexibles qui se lient à la surface des chaînes de cellulose (Ridley et al, 2001, Cosgrove, 2001) (Fig. 8). Les hémicelluloses existent dans la paroi primaire et la paroi secondaire. La quantité des hémicelluloses du bois varie de 10% à 30%. L'hémicellulose est un polymère branché avec différents types de sucres. Les hémicelluloses sont synthétisés à partir de nucléotides de sucres dans l'appareil de Golgi par des enzymes de type glycane synthase et glycosyltransférase. Par rapport à la cellulose, l'hémicellulose ne contient pas que des glucoses anhydres. En plus du glucose, les monomères de l'hémicellulose peuvent être le xylose, le mannose, le galactose, le rhamnose, ou

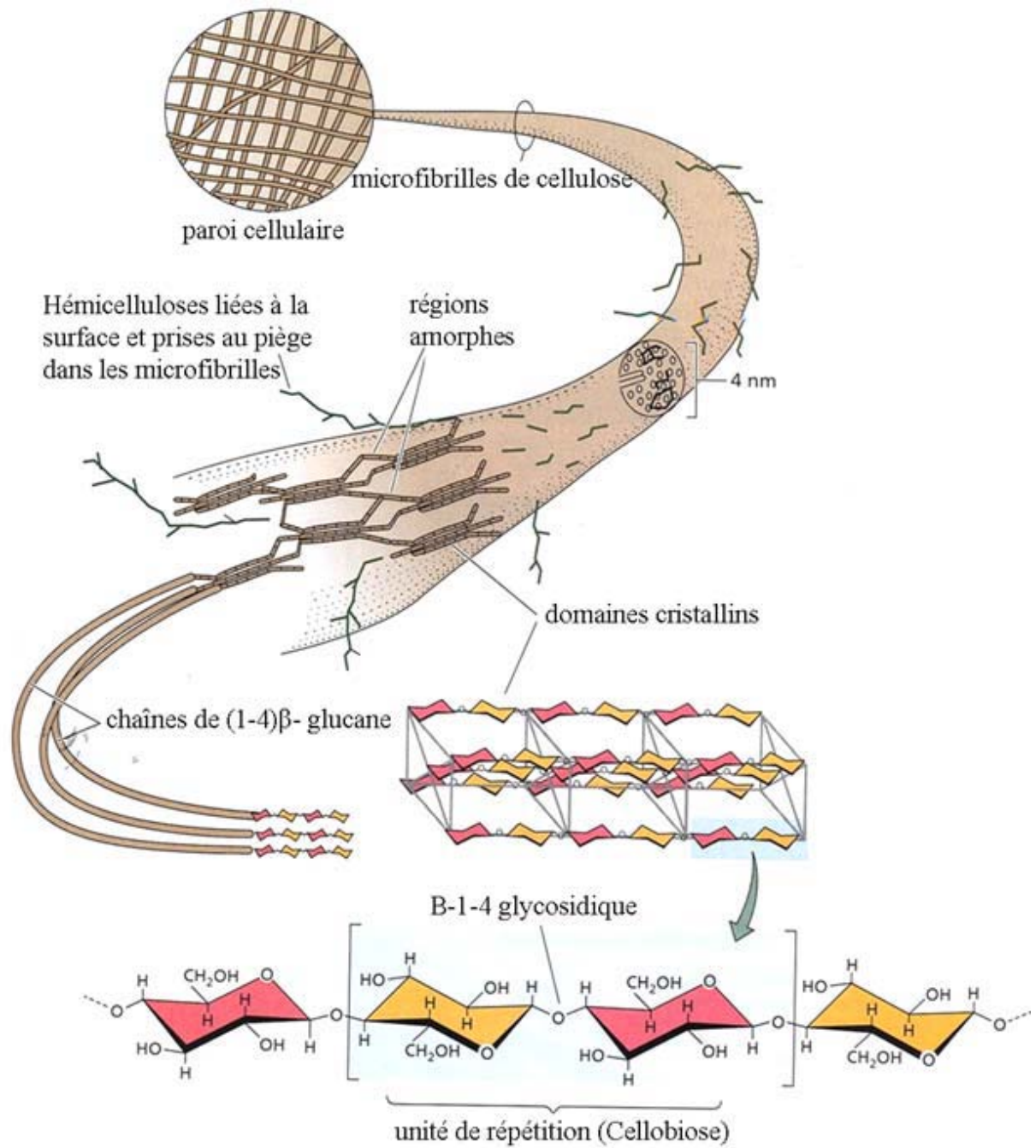


Fig. 7 : Modèle structural d'une microfibrille de cellulose. Une microfibrille est composée de douzaines de molécules de cellulose qui s'assemblent en une matrice cristalline. Les microfibrilles peuvent interagir avec d'autres polysaccharides présents dans la paroi. Certaines hémicelluloses peuvent également être piégées à l'intérieur de la microfibrille et liées à la surface.

l'arabinose. Le xylose est toujours l'ose le plus représenté mais les acides mannuronique et galacturonique sont aussi souvent présents. Dans leur état naturel, les hémicelluloses ont un degré de polymérisation compris entre 200 et 300 et leur structure dépend fortement de l'espèce végétale. Ces hémicelluloses ont aussi une structure chimique très différente selon l'espèce, le type cellulaire, la localisation dans la paroi ou bien encore l'âge des tissus (Frengel et Wegener, 1984 ; Shimizu, 1991). Les hémicelluloses sont plus abondantes dans les parois secondaires que dans les parois primaires. Les hémicelluloses sont classées en différents types : les xylanes, les mannanes, les xyloglucanes et les arabinogalactanes. Les xylanes sont un composant principal des hémicelluloses, et le deuxième polysaccharide naturel le plus abondant. Les xylanes sont des polymères de β -1,4-D-xylopyranosyl. Plusieurs enzymes sont nécessaires pour la dégradation de xylanes, mais la principale enzyme impliquée est la xylanase. Le deuxième composant principal dans les hémicelluloses est le xyloglucane. Le xyloglucane est composé d'un squelette de D-glucoses liés en β -(1,4), et ces glucoses peuvent être substitués en α -(1,6) par des résidus de D-xylose. Le xyloglucane a été particulièrement étudié car il est essentiel pour déterminer l'extensibilité de la paroi primaire (Cosgrove, 2005). L'UDP-xylose est nécessaire pour la synthèse de xyloglucane et de xylanes. Ainsi, l'UDP-xylose est un sucre nucléotidique clé impliqué dans la formation des hémicelluloses. Un autre type d'hémicellulose que l'on trouve dans les parois primaires est le mannane. Le mannane peut avoir un squelette de D-mannoses liés en β -(1,4) ou un squelette de D-mannose et de D-glucose, également unis en β -(1,4). Ces derniers sont alors appelés glucomannanes. Les xylanes et les glucomannanes sont les hémicelluloses les plus abondants chez les bois durs. Les deux types de mannanes peuvent être substitués en α -(1,6) par des résidus de D-galactose, et on parle alors de galactomannanes ou galactoglucomannanes. Les mannanes sont particulièrement abondants dans les graines et sont supposés être des polysaccharides de réserve (Buckeridge et al., 2000; Hoch, 2007).

Les enzymes qui dégradent les hémicelluloses sont des hémicellulases (R.F.H.Dekker, 1985). Dans ces hémicellulases, on distingue des β -D-galactanases, des β -D-mannanases et des β -D-xylanases. Ces enzymes sont les plus importantes, mais il y a aussi d'autres enzymes qui participent à la dégradation des hémicelluloses : les β -xylosidases, les β -D-galactosidases, les β -D-mannosidases et les α -L-arabinosidases. Ces enzymes ont en charge de dégrader les disaccharides provenant de la lyse des hémicelluloses pour libérer les monosaccharides. Toutes ces enzymes agissent en synergie. Par exemple, l'action de β -D-xylanases génère du xylobiose qui est dégradé par la β -xylosidase en xylose. Au cours de l'action des hémicellulases, une exo-enzyme agit sur les unités terminales de la chaîne moléculaire pour

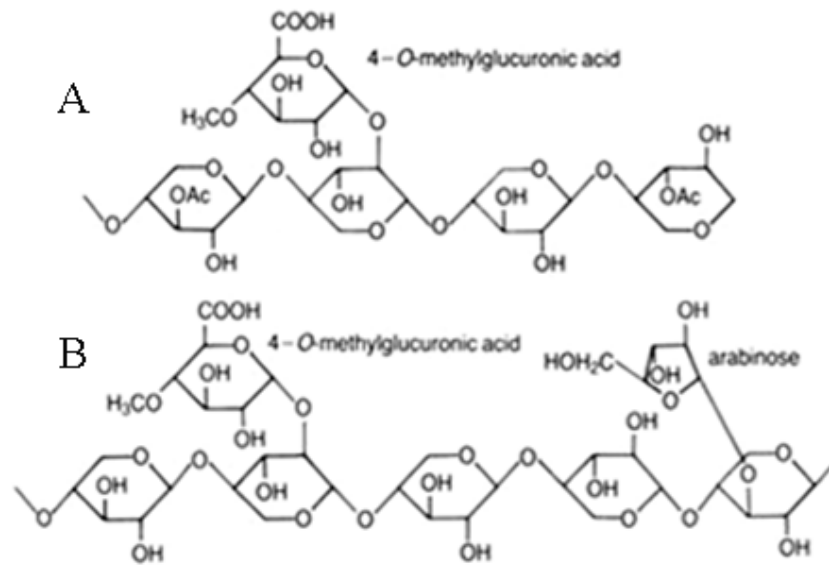


Fig. 8 : Structures d'hémicelluloses. A) exemple d'une hémicellulose composée d'unités répétées de xylose substituées avec des groupes O-acétyl et de l'acide 4-O-méthylglucuronique. B) exemple d'une hémicellulose composée d'unités répétées de xylose substituées avec de l'acide 4-O-méthylglucuronique et de l'arabinose.

libérer des monosaccharides, et en même temps une endoenzyme agit sur les liaisons β 1-4 ou bien β 1-3. Cette action se traduit par une chute du degré de polymérisation suivi de la libération de mono ou disaccharides.

I.4.4.3 Les pectines.

Les pectines sont produites dans toutes les cellules végétales des plantes vasculaires. Elles constituent environ 30 % des parois primaires et elles sont absentes des parois secondaires. C'est un polysaccharide hétérogène caractérisé par une teneur élevée en acide D-galacturonique. Les pectines jouent un rôle structural dépendant des conditions ioniques du milieu, et notamment du rapport entre les ions H^+ et les ions Ca^{++} . Les pectines sont synthétisées, à partir du monosaccharide, en trois étapes: initiation, élongation et arrêt de la synthèse dans l'appareil de golgi. Les pectines sont polymérisées dans le compartiment cis-golgien. Puis, elles sont fortement méthylestérifiées dans le compartiment médian, par des pectines méthyltransférases qui transfèrent un groupement méthyle de l'ion sulfonium de la S-adénosyle méthionine sur le groupement carboxyle du D-galacturonate. Des chaînes latérales sont ajoutées dans le compartiment trans-golgien. Les polymères nouvellement synthétisés sont ensuite déversés dans la paroi par le biais de vésicules d'exocytose. Après avoir été sécrétées dans la paroi, les pectines subissent des modifications. Elles peuvent être O-acétylées et déméthylestérifiées. . Le niveau de méthylation des pectines, dans la paroi (Zhang et Staehelin, 1992) est régulé par des pectine méthylestérases (PME) qui libèrent les groupements méthyles et génèrent ainsi des résidus carboxyliques libres au niveau des acides galacturoniques. Les pectines se définissent par leur caractère anionique variable. Les pectines forment des réseaux stables mais élastiques, de mailles retenant en plus ou moins grande quantité les molécules d'eau. D'une part, l'action *in muro* des PME affecte la répartition des charges négatives et favorise un pH pariétal acide. Finalement, la structure chimique des pectines peut être fractionnée en quatre domaines : (1) homogalacturonane (HGA), (2) rhamnogalacturonane de type I (RGI), (3) rhamnogalacturonane de type II (RGII) et (4) xylogalacturonane (XGA) (Fig. 9).

a) Les homogalacturonanes.

Les homogalacturonanes sont des polymères linéaires de résidus d' α -(1,4)-D-galacturonate qui peuvent constituer plus de 60% des pectines dans la paroi des cellules végétales. L'homogalacturonane est synthétisé dans le (*cis*-Golgi), méthyle-estérifié

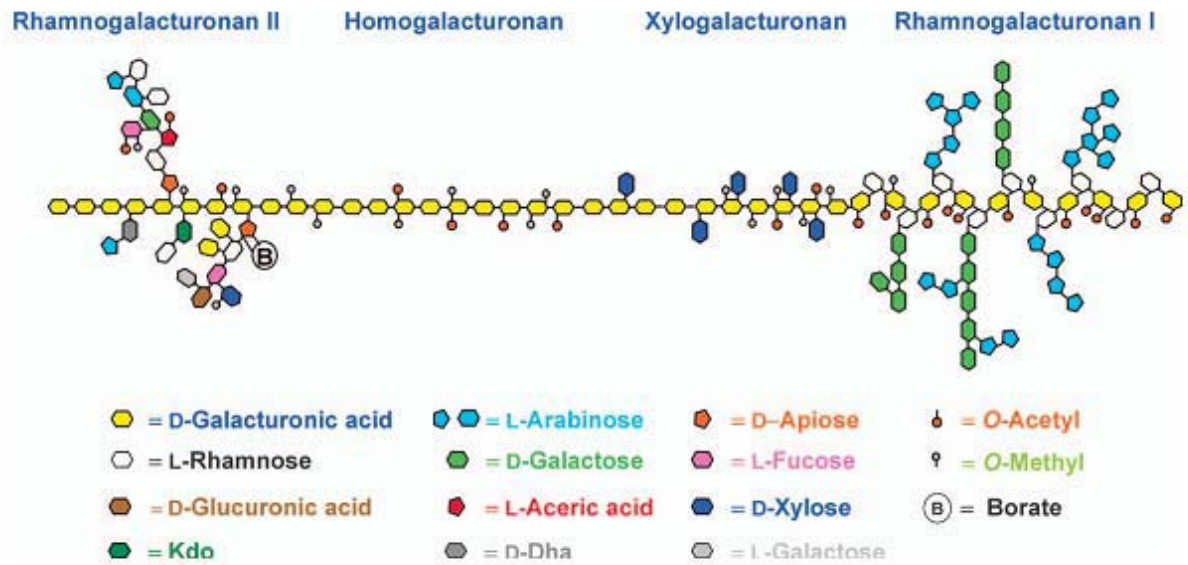
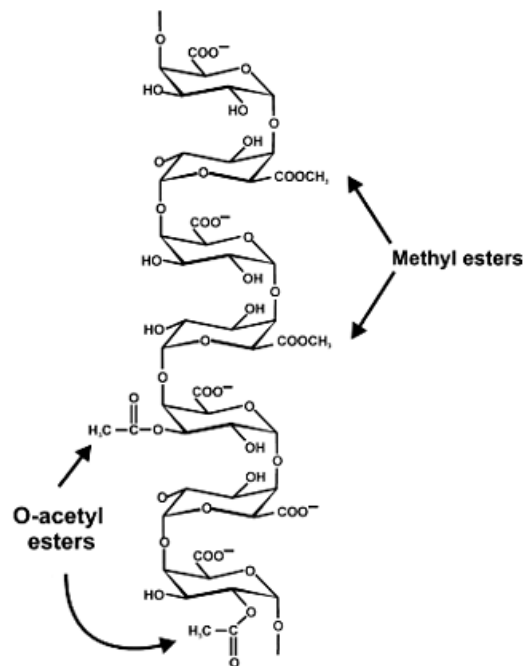


Fig. 9 : Structure et composition biochimique des différents domaines de pectines. Les groupements pectiques sont classés en 4 domaines: Homogalacturonane, Rhamnogalacturonane I, Rhamnogalacturonane II et Xylogalacturonane qui sont étalés en fonction de leur structure et leur composition.

dans le (*medial*-Golgi), substitué dans le (*trans*-Golgi) et sécrété dans un état hautement méthyl-estérifié (Zhang and Staehelin, 1992; Staehelin and Moore, 1995; Sterling et al., 2001). Deux chaînes d'homogalacturonanes peuvent interagir par des ponts calciques (fig. 10A). Cette interaction est contrôlée par le degré de méthyl-esterification du galacturonate, qui masque les groupes carboxyle qui participent à ces liaisons ioniques (Fig. 10). Les pectine méthylestérases (PME) sont des enzymes qui catalysent la déméthylestérification des pectines de la paroi des cellules végétales, ce qui a pour effet de libérer du méthanol et d'acidifier les pectines. Les PME sont synthétisées sous forme de précurseurs pré-proprotéiques. Selon Micheli (2001), il existerait deux classes de gènes PME codant pour les pré-pro-protéines. Les gènes de classe 1 possèdent 2 à 3 introns et une longue pro-région, tandis que ceux de la classe 2 se caractérisent par 5 ou 6 introns et une courte pro-région (comme les PME des phytopathogènes). La pré-région code pour un peptide signal qui permet l'adressage de la proprotéine vers le réticulum endoplasmique. Seule la partie mature est retrouvée dans la paroi cellulaire (Micheli, 2001). Il y a donc sûrement une excision de la pro-région juste avant ou après le dépôt dans la paroi. La pro-région pourrait alors être dégradée ou avoir une action dans la cellule ou l'apoplasme. Micheli (2001) émet comme hypothèse que cette pro-région participerait au fonctionnement biologique de la PME et à son adressage vers la paroi. Elle pourrait également avoir un rôle de chaperonne sur la partie mature ou encore être un inhibiteur de l'activité enzymatique. Micheli suggère que la quasi inexistence de la pro-région des PME bactériennes pourrait être en corrélation avec leur action invasive, non maîtrisée. Chez les dicotylédones, les PME sont présentes sous de nombreuses isoformes : 89 gènes PME ont été identifiés chez *Populus trichocarpa*. Ces nombreuses isoformes de PME se distinguent par leurs masses moléculaires, leurs points isoélectriques et leur pH optimal d'activité. La plupart des travaux menés depuis trente ans sur les PME montrent que celles des plantes ont plutôt un pH basique ou neutre et rares sont celles qui ont un pH acide (Mareck et al., 1995; Alonso et al., 1996). La gamme de points isoélectriques trouvés chez les PME varie de 4,5 à plus de 11 (MacDonald et al., 1993). En parallèle, la masse moléculaire des PME varie de 20 kDa (Gaffé et al., 1992) à 57 kDa (Giovane et al., 1990). La partie mature des PME, après avoir été intégrée dans la paroi agit de deux façons différentes. Son mode d'action sur les HGA est soit sporadique (de place en place), soit processive (linéaire) c'est à dire en progressant le long de la chaîne d'HGA (Micheli, 2001; Fig. 11). L'action sporadique favoriserait l'intervention des endogalacturonases et des expansines, entraînant alors la dégradation de la paroi et une extensibilité accrue. L'action processive fait apparaître des groupements carboxyles proches les uns des autres, qui interagissent alors avec des ions

A



B

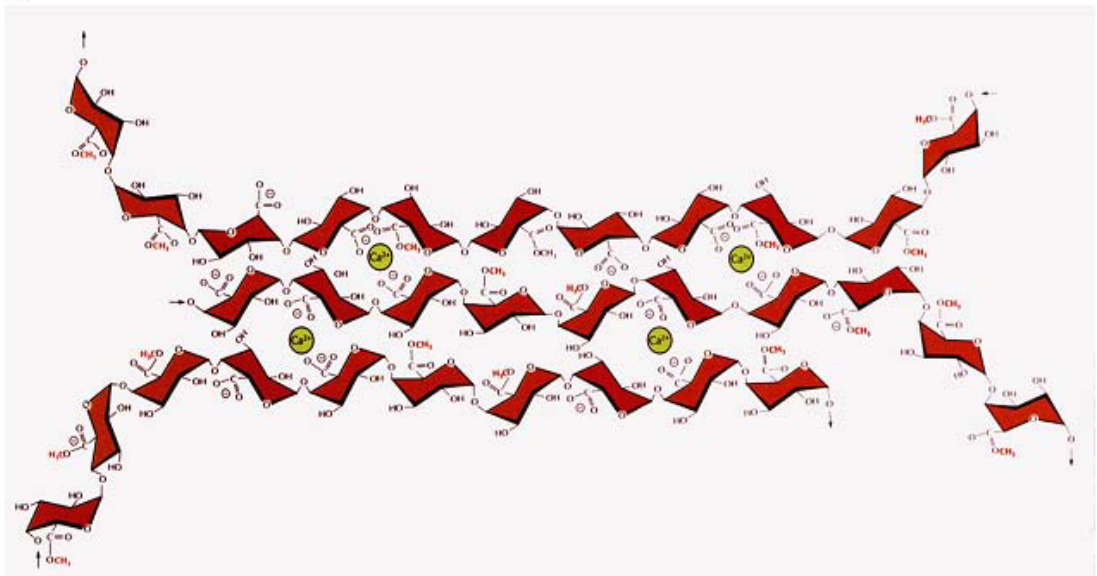


Fig. 10 : Modèle structural des homogalacturonanes (HGA). A) L'HGA est un polymère linéaire de α -(1,4)-D-galacturonate. Ces résidus peuvent être méthyl-estérifiés au niveau du groupement carboxyle et acetyl-estérifiés sur le 4^{ème} carbone. B) Représentation des interactions dépendantes du calcium entre 3 chaînes d' HGA. La liaison entre les ions calcium et les groupements carboxyles des pectines forment des zones de jonction, dont la structure est appelée "boîte à œufs".

Ca^{++} pour former des structure de "boîtes à œufs" qui sont des zones de jonctions entre 2 chaînes d'HGA. La formation des jonctions en « boîtes à œufs » nécessite une succession d'environ dix groupes carboxyles libres. Cela provoque la formation d'un réseau gélifié qui diminue la porosité pariétale, limite l'action des endogalacturonases et rigidifie alors la paroi. L'action des PME peut avoir d'autres conséquences sur la cellule. En effet, le degré de méthylation des pectines sécrétées dans la paroi étant variable, le pH l'est également et ainsi l'action des PME peut faire varier le degré d'acidité pariétal en réponse à une situation donnée et ainsi moduler l'activité d'autres enzymes pariétales.

b) Les rhamnogalacturonanes-I

Les rhamnogalacturonanes-I (RG-I) sont composés de la répétition d'une unité disaccharide $[2\text{-L-rhamnopyranose-(1,4)-D-galacturonylpyranose-(1)]_n$ où n peut être supérieur à 100 (Fig. 12). Les groupes galacturonyl peuvent être acétylés sur l'oxygène du 2° ou du 3° carbone (O-2 au O-3). Les résidus rhamnosyl peuvent être substitués en O-4 avec des sucres neutres. Ces substitutions peuvent être des résidus uniques de D-galactopyranose en β -(1,4) mais aussi polymériques tels que l'arabinogalactane ou l'arabinane (50 résidus ou plus). L'arabinogalactane de type I est composé d'un squelette de β -(1,4)-D-galactopyranose, qui à son tour peut être substitué en O-3 par des résidus de α -L-arabinofuranose. L'arabinane est constitué d'un squelette de α -(1,5)-L-arabinofuranose qui est parfois substitué en O-2 et/ou O-3 par d'autres résidus α -L-arabinofuranose. L'abondance et l'identité des chaînes latérales présentes dans le (RG-I) varient considérablement entre espèces (Vincken et al., 2003). La structure des arabinanes est connue d'un point de vue global, mais les détails restent méconnus. La littérature montre que les arabinanes forment une structure ramifiée (Cardoso et al., 2007; Harholt et al., 2006), mais il n'est pas clair si ces ramifications sont des résidus uniques ou des chaînes secondaires. Un deuxième point qui reste à élucider est le type de liaison des chaînes latérales d'arabinanes. Certaines analyses montrent que les chaînes d'arabinanes ne contiennent que des liaisons en α -(1,5) (Harholt et al., 2006; OBro et al., 2004), alors que d'autres résultats indiquent la présence de L-arabinoses en α -(1,3) (Cardoso et al., 2007). D'autre part, il a été montré que les arabinanes de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) peuvent aussi être substitués par des chaînes de galactanes (OBro et al., 2004). A ce jour, une analyse détaillée des arabinanes d'*Arabidopsis thaliana* n'a pas encore été réalisée, mais les résultats disponibles suggèrent qu'ils sont composés de chaînes en α -(1,5),

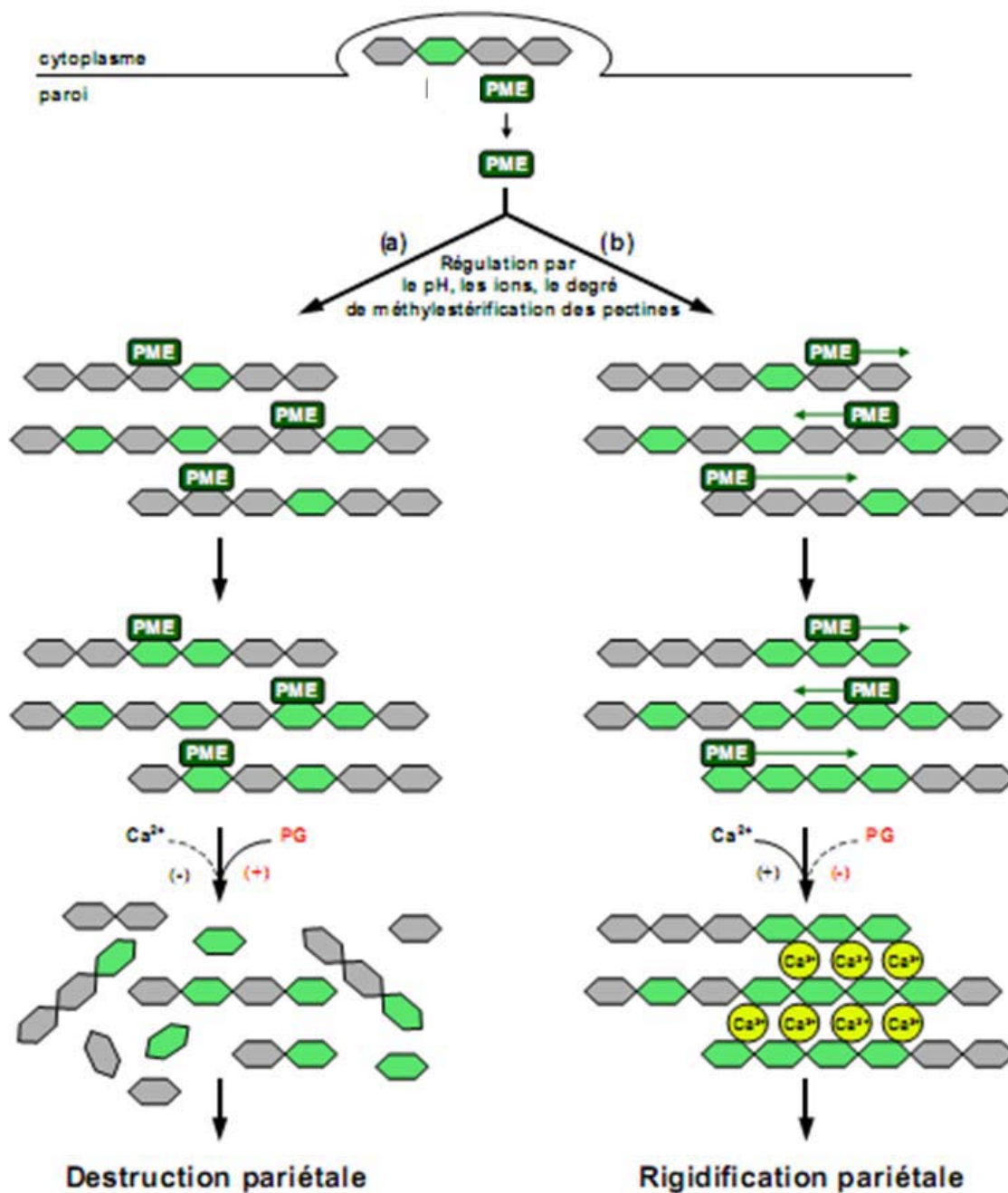


Fig. 11 : Modes d'action des pectines méthylestérases (PME) (d'après Micheli, 2001). Selon les propriétés de la paroi cellulaire, la PME mature (en vert) peut agir de façon aléatoire (a) ou de façon linéaire, l'action aléatoire facilite l'action des endopolygalacturonase et contribue ainsi à un relâchement de la paroi cellulaire. (b) l'action linéaire donne lieu à des blocs de groupes carboxyle libres qui interagissent avec les ions bivalents (Ca^{2+}). Les acides Méthylesterifiés galacturoniques méthylés sont représentés en gris et les acides galacturoniques diméthylés en vert.

avec des ramifications en α -(1,2) et/ou α -(1,3) (Harholt et al., 2006). La présence de substitutions galactanes reste à démontrer.

c) Les rhamnogalacturonanes-II

Bien que les rhamnogalacturonane-II (RG-II) et les RG-I aient le même nom, ils ont des structures différentes. Les RG-II comprennent approximativement neuf résidus d'acide galacturonique auxquels sont associées quatre chaînes latérales complexes (Fig. 13). Ces chaînes latérales contiennent des monosaccharides particuliers, tels que le D-apiose, le L-acerate, le 2-O-méthyl L-fucose, le 2-O-méthyl D-xylose, le L-galactose, l'acide 3-déoxy-D-lyxo-2-heptulosarique, et le 2-keto-3-deoxy-D-manno octulosonate. Les RG-II sont restés des polysaccharides énigmatiques durant de très nombreuses années. Matoh et al. (2000) ont démontré l'existence d'un dimère de RG-II associés au travers d'une liaison 1:2 borate-diol diester. La liaison ester est plus précisément formée entre chaque résidu apiosyl de la chaîne latérale A. Le RG-II est l'un des polysaccharides les plus originaux identifiés à ce jour dans la nature. Il suscite actuellement un intérêt grandissant de la part de la communauté scientifique en raison d'une part de ses capacités à interagir avec le bore et, d'autre part, de son rôle supposé dans la structuration de la paroi des cellules végétales. Perez et al. (2003) ont proposé un modèle d'organisation tridimensionnelle d'une telle interaction, par couplage d'études structurales et de dynamique moléculaire.

I.4.4.4 Les lignines.

Les lignines sont le second composé organique de la biosphère terrestre après la cellulose. Elles représentent 15 à 36% de la masse de matière sèche du bois contre seulement 3 à 15% chez les graminées et autres plantes annuelles (Sarkanen et Hergert, 1971; Hartley et Jones, 1977). Les lignines sont des polymères tridimensionnels provenant de la polymérisation radicalaire de trois alcools phénylpropénoïques: l'alcool coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique (Sakakibara, 1991). Les proportions des différents monomères varient selon l'espèce végétale et la localisation au sein de la paroi (Freudenberg, 1965 ; Sakakibara, 1980). La nature de la lignine dans les différentes parties d'une même plante peut aussi être différente. Alors que sa composition a été très étudiée, la structure de la lignine n'est pas encore totalement identifiée.

Les lignines contribuent à la résistance mécanique des parois et confère une résistance aux agents pathogènes. Leur caractère plutôt hydrophobe entraîne une résistance à l'eau et

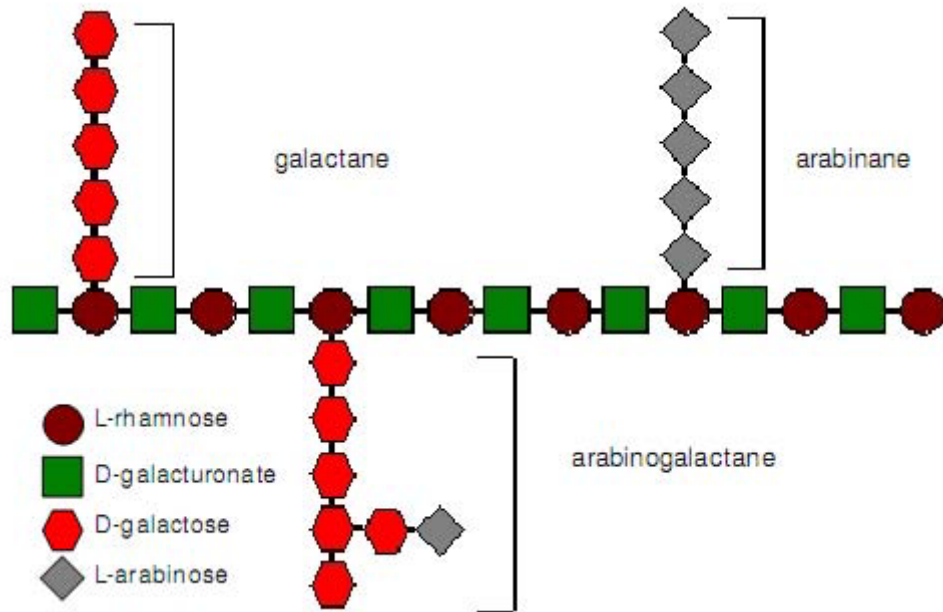


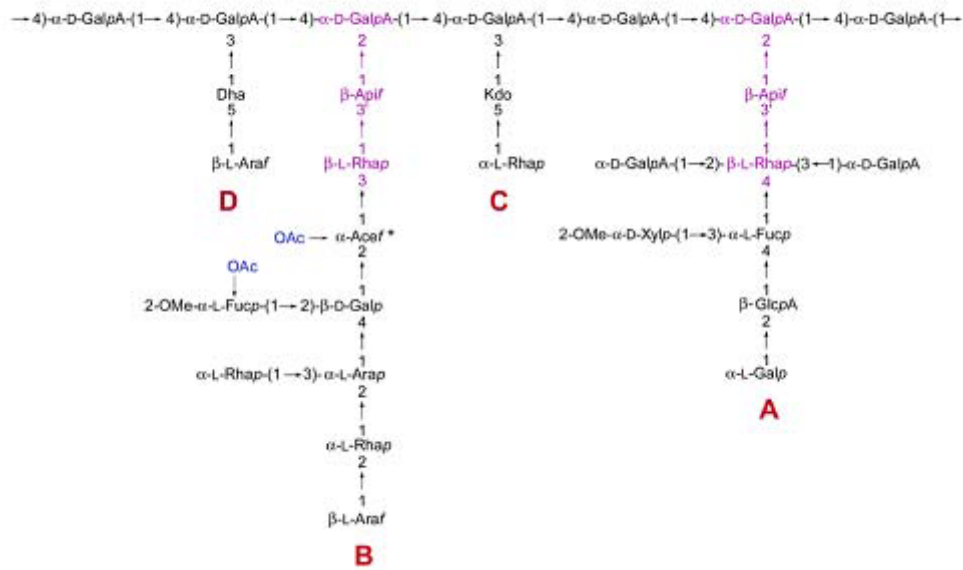
Fig. 12: modèle structural d'un rhamnogalacturonane-I (RG-I). Le RG-I est composé d'un squelette de D-galacturonate et de L-rhamnose qui peut être substitué par des chaînes latérales de galactane, d'arabinane ou d'arabinogalactane.

participe au contrôle du transport des solutions ainsi que de la teneur en eau des plantes. Enfin, elles participent à la cohésion des fibres dans la partie boisée.

Les 3 monolignols, conduisent à un polymère de lignine constitué respectivement d'unités hydroxyphényle (H), guaiacyl (G) et syringyle (S). On trouve des unités hydroxyphényles (type H) dans les parois des cellules végétales des herbacées angiospermes et des gymnospermes en très faible proportion mais elles sont plus abondantes dans les cellules formant le bois de compression, ainsi que chez plusieurs graminées. Les lignines guaiacyles (type G) sont présentes dans les lignines des angiospermes et gymnospermes. On observe une proportion significative de polymère de lignine avec des unités syringyl (type S) seulement chez les angiospermes. Les monolignols sont produits par la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (Fig. 14). Il s'agit d'une voie commune pour la synthèse de la lignine mais aussi pour bien d'autres composés tels que les stilbènes, les hydroxy-coumarines et les flavonoïdes. Le métabolisme des phénylpropanoïdes débute avec la désamination de la phénylalanine par la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) puis conduit à la synthèse des cinnamoyl-CoA via la cinnamate 4-hydroxylase (C4H) et la 4-coumarate CoA ligase (4CL). Les deux étapes terminales de la synthèse des monolignols sont catalysées successivement par les enzymes cinnamoyl-CoA réductase (CCR) et alcool cinnamylique déshydrogénase (CAD) qui réduisent respectivement les fonctions cinnamoyl-CoA de la chaîne latérale en aldéhydes puis en alcools. Le degré de méthylation des monomères dépend des actions successives des hydroxylases (C3H: coumarate-3-hydroxylase, F5H: férulate-5-hydroxylase et CCoA-3H: *p*-coumaroyl-CoA 3-hydroxylase) et des *o*-méthyltransférases (COMT: acide caféique/acide 5-hydroxyférulique 3-*O*-méthyltransférase, CCoAOMT: caféoyl-CoA 3-*O*-méthyltransférase) en positions 3 et 5 du cycle aromatique. Finalement, les monolignols, qui sont des composés toxiques et instables, ne sont pas accumulés dans la cellule végétale. Dans le cas de l'alcool coniférylique chez les conifères, celui-ci est glycosylé sous forme de coniférine pour être stocké dans la vacuole puis excrété par des vésicules d'exocytose (Schmid et Grisebach, 1982).

Les monolignols (Fig. 14) sont synthétisés dans l'appareil de Golgi puis transportés vers la paroi pour y être polymérisés. Le processus de lignification consiste en l'assemblage, ou polymérisation, des précurseurs monolignols entre eux via des réactions de couplage de radicaux. Ce processus est permis après la déhydrogénation des monolignols par des enzymes telles les peroxidases, les laccases, les polyphénols oxidases et les alcools coniféryliques oxydases (Boerjan et al., 2003). Le dépôt des lignines s'initie au niveau des coins cellulaires dans la lamelle moyenne et la paroi primaire (Boerjan et al., 2003). La polymérisation *in situ*

A



B

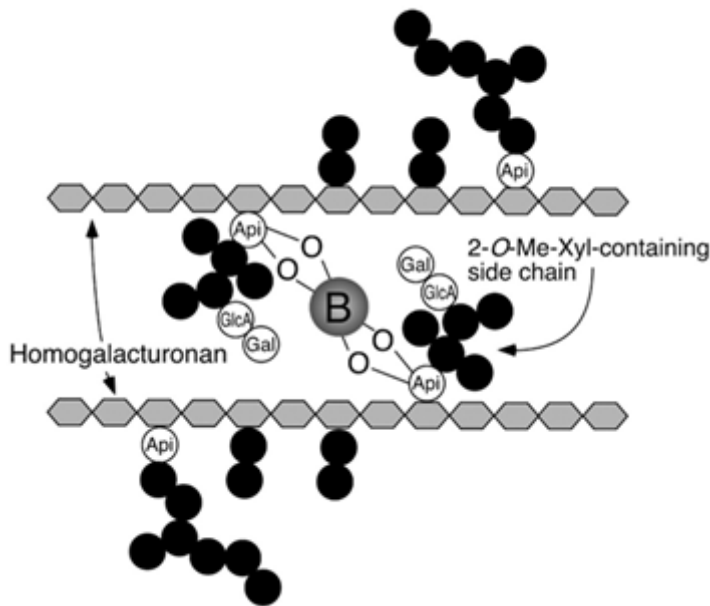


Fig. 13 : Propriétés biochimiques des rhamnogalacturonanes. A) modèle structural du rhamnogalacturonane II. Le RG II consiste en un squelette d'HGA substitué par quatre chaînes latérales complexes, nommées A, B, C et D. Source: <http://www.uea.ac.uk/cap/carbohydrate/projects/RGII.htm>). B) Pont ester de borate entre deux chaînes RG II. GlcA, L'acide glucuronique ; Api, Apiose ; Gal, Galactose.

des lignines est influencée par l'environnement pariétal incluant la lignine préalablement déposée. Les liaisons chimiques effectuées avec des celluloses et hémicelluloses insolubles ainsi que des protéines pariétales vont graduellement éliminer l'eau et créer un environnement hydrophobe.

Dans la littérature, il existe différentes lignées transgéniques de peupliers modifiées pour la voie des lignines, notamment pour les gènes : 1) CAD (Baucher et al., 1996 ; Lapierre et al., 1999 ; Pilate et al., 2002), ces peupliers transgéniques (sens et antisens) ont eu un environ 70% réduite à l'activité de CAD, et était associé à une coloration rouge de xylème. 2) CCR (Leplé et al., 1998), les peupliers transgéniques réprimés de la CCR a été associée à une réduction des teneurs en lignine jusqu'à 50% et une coloration brun-orange du xylème. 3) COMT (Lapierre et al., 1999 ; van Doorselaere et al., 1995 ; Pilate et al., 2002), les lignes transformé par antisens, avait réduit environ 50% de l'activité de la COMT, et associée à une coloration rose pâle du xylème.

I.4.4.5 Les protéines pariétales.

La paroi comprend d'une part un grand nombre de protéines structurales renforçant sa cohésion et sa stabilité et d'autre part un arsenal d'enzymes impliquées dans la modification et le remaniement de la paroi. Ces protéines représentent 1 à 10% de la matière sèche des parois cellulaires chez les dicotylédones (Showalter, 1993 ; 2001). Les protéines pariétales de structure sont divisées en plusieurs familles. Parmi ces familles, celle des protéines riches en hydroxyprolines (HRGPs) est caractérisée par des motifs Ser-(Hyp) n ($n \geq 3$) séparés par des régions riches en Tyr, Lys, His et Val. Les HRGPs constituent la classe de protéines pariétales la plus étudiée. Cette famille englobe les extensines et les arabinogalactanes (AGPs). Les deux autres familles majeures des protéines structurales sont les protéines riches en glycine (GRPs) et les protéines riches en proline (PRPs). Ces protéines qui forment la partie azotée de la matrice pariétale constituent une structure rigide et inextensible par l'intermédiaire de liaisons avec les polysaccharides. Les extensines sont des protéines structurales de la paroi primaire des cellules végétales, et ces protéines sont fortement O-glycosylées avec un point isoélectrique basique. Le caractère basique des extensines est dû à sa richesse en résidus lysine, permettant l'interaction de ces derniers avec les groupements acides des pectines (Miller et Fry, 1992). L'extensine a une structure en hélice du fait de sa forte proportion d'hydroxyproline. Cette structure ainsi que les nombreux ponts formés avec la cellulose renforce la cohésion de la paroi. Les extensines sont impliquées dans les réactions de défense

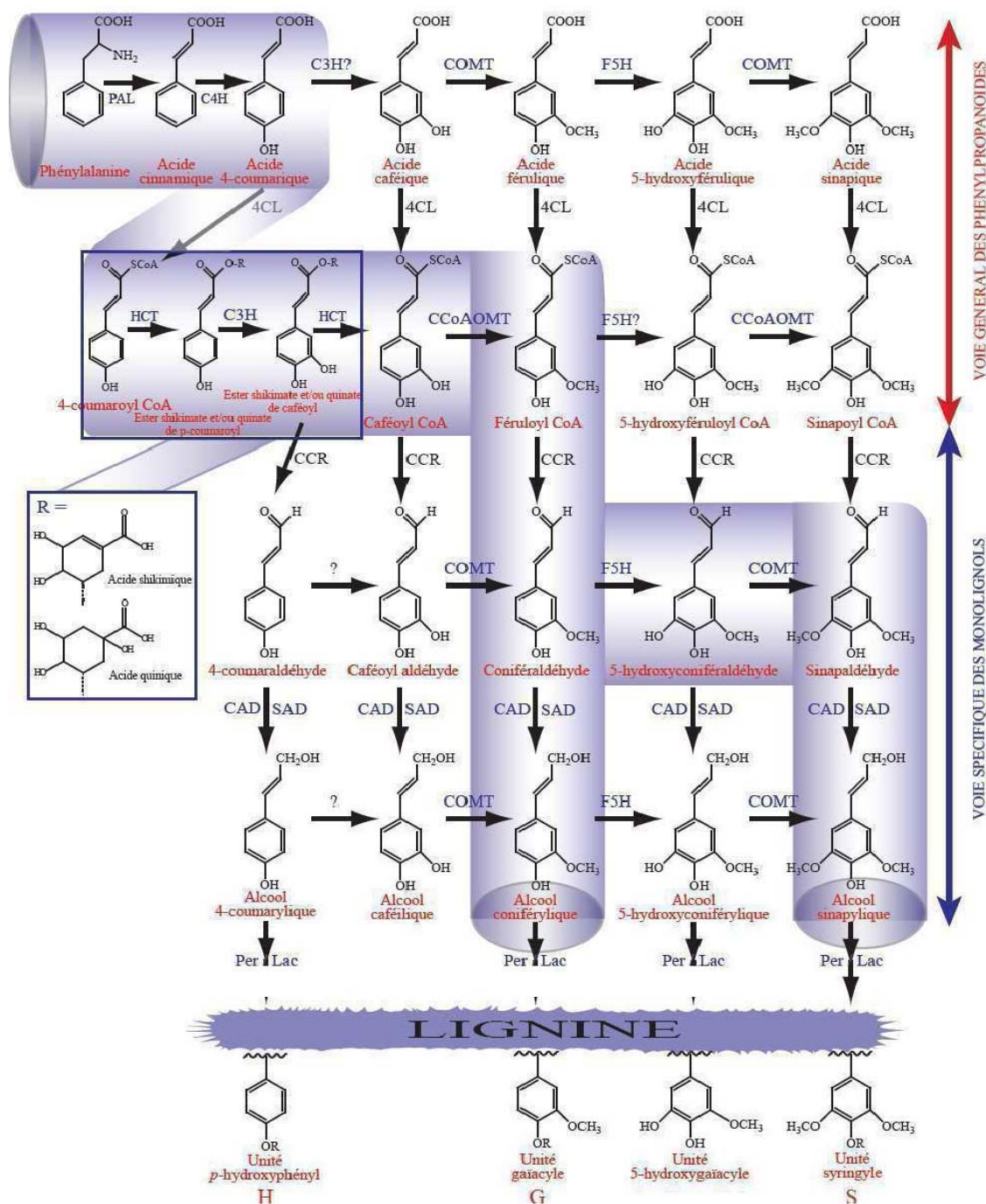


Figure 14 : Voies de biosynthèses de monolignols. Les enzymes mentionnées sous forme abrégées sont les suivantes: phénylalanine ammonia lyase (PAL), cinnamate 4-hydroxylase (C4H), coumarate 3-hydroxylase (C3H), acide caféique/acide 5-hydroxyférulique O-méthyltransférase (COMT), férulate 5- hydroxylase (F5H), 4-hydroxycinnamate CoA ligase (4CL), hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransférase (HCT), caféoyl CoA O-méthyltransférase (CCoAOMT), cinnamoyl CoA réductase (CCR), alcool cinnamylique déshydrogénase (CAD), alcool sinapylique déshydrogénase (SAD), peroxydases (Per), laccases (Lac). La voie surlignée en violet semblerait être la plus courante chez les angiospermes. D'autres voies ont toutefois été identifiées chez certaines espèces et/ou dans différentes conditions environnementales ne permettant pas une "canalisation" certaine de la biosynthèse des monolignols.

(Van holst et Varner, 1984). Les AGPs sont, quant à elles, hautement glycosylées et sont composées de plus de 90% de saccharides (Bacic et al., 1996), avec principalement le L-arabinose et le D-galactose. Aucune fonction ne leur est clairement attribuée, mais il semblerait qu'elles jouent un rôle au niveau de l'adhésion cellulaire et dans la transmission des informations à la cellule durant la différenciation (McNeil et al., 1984).

II- Fonctionnement hydraulique.

II.1 Les voies de circulation de l'eau.

Les principes dynamiques régissant le comportement hydrique du végétal découlent du fait que l'eau représente environ 80% du volume de tous les tissus végétaux, et ainsi, forme un milieu continu d'une extrémité à l'autre du végétal. Le flux global transitant dans la plante est proportionnel à la différence de potentiel hydrique entre la surface externe des racines et l'air environnant les feuilles. La circulation de l'eau, entre le sol et l'atmosphère, se fait donc des racines vers les feuilles (Fig.15). Les 99% du trajet ont lieu dans les conduits du xylème et les 1% restant du trajet ont lieu dans le système extravasculaire. Le circuit de l'eau dans les racines se divise en plusieurs étapes: l'absorption, la circulation radiale à travers les tissus non vasculaires puis la circulation axiale dans le xylème. L'absorption de l'eau du sol se produit au niveau des cellules épidermiques. Le trajet radial comprend le franchissement du cortex puis de l'endoderme qui constitue une barrière apoplasmique importante avec la bande de Caspari constituée par une lamelle de subérine et une paroi secondaire épaisse (Steudle, 2000 et 2001). Trois voies de passage radiales de l'eau sont possibles (Fig.15). La première voie est apoplasmique: l'eau circule à travers les parois cellulaires ; cette voie serait la principale empruntée par l'eau pendant la journée. La deuxième voie est symplasmique: l'eau circule par l'intermédiaire de plasmodesmes entre les cellules. La troisième voie est transcellulaire: l'eau traverse les membranes plasmiques des cellules. Ce transport transcellulaire est facilité par les aquaporines. Pour les voies symplasmique et transcellulaire, l'eau circule alors à l'intérieur des cellules.

Lorsqu'elle atteint les vaisseaux conducteurs, l'eau circule dans le xylème en direction axiale. L'absorption puis le trajet radial sont considérés comme des étapes limitantes dans le transfert de l'eau, les résistances radiales étant largement supérieures aux résistances axiales dans les racines. La circulation de l'eau dans le xylème se poursuit dans les tiges et jusqu'aux organes foliaires. La circulation de l'eau dans les vaisseaux du xylème est apoplasmique et le passage latéral de la sève entre deux vaisseaux se fait à travers des punctuations. Au niveau

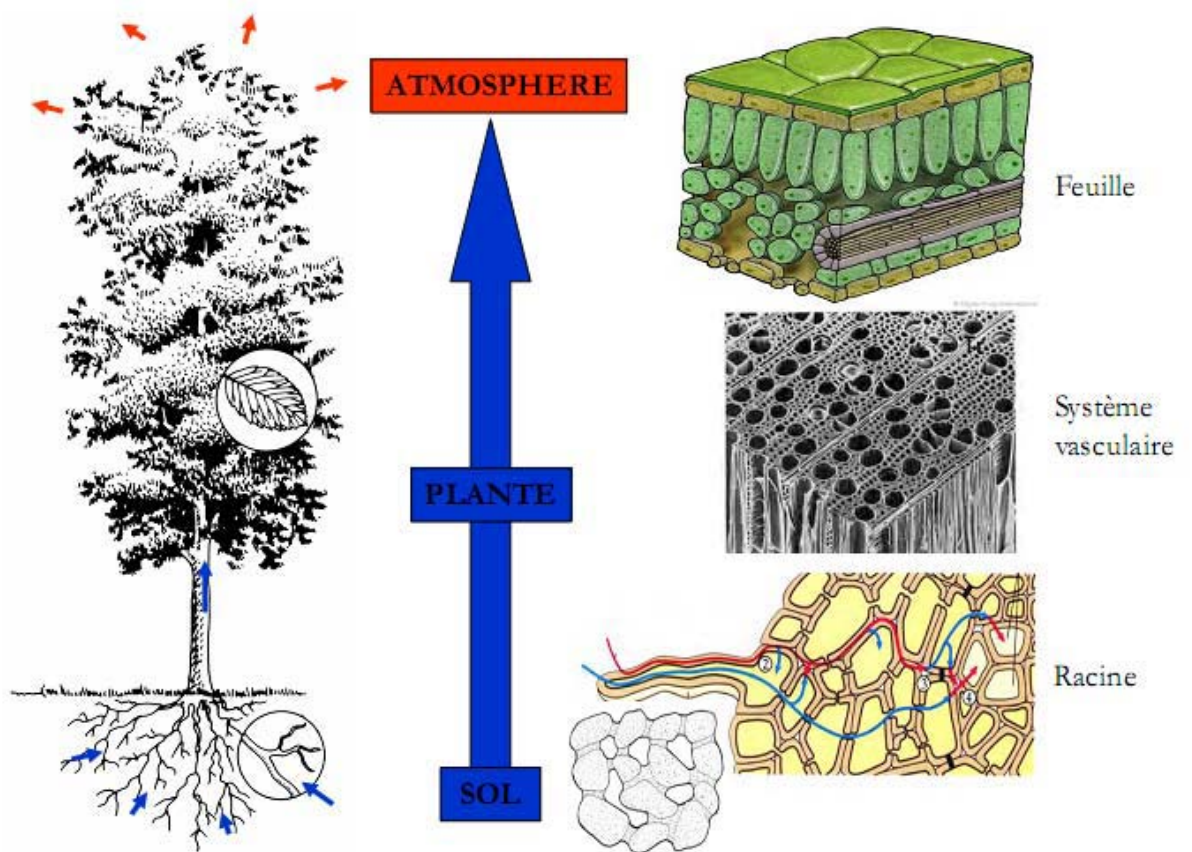


Fig. 15 : Voies de circulation de l'eau dans un arbre. L'eau circule radialement dans les racines, puis axialement par le système vasculaire des racines vers les feuilles, et enfin radialement dans les feuilles. Le transport radial de l'eau des vaisseaux du xylème aux autres cellules se fait trois voies: la voie apoplasmique, la voie symplasmique, la voie transcellulaire.

des feuilles, le trajet vasculaire est interrompu et comme pour les racines, l'eau doit circuler de manière extravasculaire entre les vaisseaux du xylème et les cavités sous stomatiques qui sont les sites d'évaporation. Le trajet se fait aussi par les trois voies décrites précédemment: apoplasmique, symplasmique et transcellulaire.

II.2 les résistances au flux de sève.

La conductance hydraulique de l'arbre dépend des résistances hydrauliques de chaque partie du réseau vasculaire : la résistance foliaire constitue au moins 30% de la résistance hydraulique totale, la résistance racinaire constitue au moins 65% et la résistance des autres organes constitue au moins 5%. L'ouverture stomatique augmente la perte d'eau des plantes par transpiration et assure un contrôle clef de la conductance de la sève. La résistance hydraulique foliaire dépend de l'architecture des veines dans la feuille et des propriétés membranaires des cellules notamment leur contenu en pores cellulaires permettant le passage de l'eau (Sack et Holbrook 2006, Cochard et al. 2007).

L'efficacité du transport de l'eau dans le xylème dépend tout d'abord des dimensions des vaisseaux. Dans le cas idéal d'un cylindre à écoulement laminaire, la loi de Hagen-Poiseuille stipule que cette conductance est proportionnelle au diamètre à la puissance 4. Ainsi, un gros vaisseau a une meilleure conductance qu'un ensemble de petits vaisseaux formant une surface identique. Mais la conductance est également influencée par la structure et la surface des ponctuations à travers lesquelles l'eau passe d'un vaisseau à l'autre lors de son ascension. Les ponctuations représentent de l'ordre de 50 % de la résistance hydraulique du xylème (Choat et al. 2008).

II.3 La théorie de tension-cohésion

Les mécanismes de la théorie de " Tension-Cohésion " proposée par Dixon et Joly (1895) est considérée comme la meilleure explication du mouvement de l'eau, bien qu'elle ait été sujette à controverse, même encore récemment (Canny 1995 ; Canny et al., 2001 ; Zimmermann et al., 2004). L'hypothèse a plusieurs composantes, comme son nom l'indique. La transpiration, les pertes d'eau par les parties aériennes de la plante, constitue l'élément moteur du flux d'eau à travers la plante. La cohésion fait référence à l'attraction des molécules d'eau entre elles. Les molécules d'eau sont attirées les unes aux autres, la charge négative partielle de l'oxygène d'une molécule étant attirée par l'hydrogène chargé

positivement d'une autre molécule. Ces attractions, appelées liaisons hydrogènes, sont importantes dans le mécanisme de transpiration, car elles assurent la solidité de la colonne d'eau. En effet quand une substance est comprimée, une pression positive supérieure à la pression atmosphérique est générée; inversement quand une substance est tirée par les deux bouts, une pression négative, ou une tension, est générée et elle est inférieure à la pression atmosphérique.

La circulation de l'eau reposant sur le mécanisme de " Tension-Cohésion " peut être expliquée comme une série d'étapes séquentielles:

(i) La sève brute forme un réseau continu de colonnes liquides depuis les racines, responsables de l'absorption, jusqu'aux feuilles où s'effectue le processus de transpiration. La continuité des colonnes d'eau est rendue possible par la forte cohésion des molécules d'eau entre elles malgré la forte tension exercée sur l'eau.

(ii) La structure nano-poreuse des parois pecto-cellulosiques des cellules mésophylliennes bordant la cavité sous stomatique permet la formation de ménisques eau-air de quelques nanomètres de diamètre, à l'interface entre la sève arrivée à l'extrémité du trajet et la chambre sous-stomatique où a lieu la vaporisation de l'eau.

(iii) L'énergie reçue à la surface des feuilles crée une différence de pression de vapeur d'eau entre la surface foliaire et l'intérieur de la feuille, ce qui entraîne la vaporisation de l'eau (passage de l'état liquide à l'état vapeur). La vaporisation de l'eau au niveau des ménisques eau-air génère des tensions capillaires qui entraînent une diminution du potentiel hydrique de l'eau dans les régions adjacentes. En raison de la continuité des colonnes d'eau, ce changement d'état énergétique est instantanément transféré dans l'ensemble de la plante. Les régions proches de la surface transpirante fonctionnent donc à des potentiels hydriques plus faibles (des tensions plus fortes) que les régions proches des racines. Le gradient de potentiel hydrique ($\Delta\psi$) ainsi généré est responsable du sens et de l'intensité du flux de sève brute.

(iv) La sève brute circule dans un état métastable. Une phase gazeuse plus stable, à pression atmosphérique, peut donc apparaître dans la phase liquide : c'est le phénomène de cavitation. Lorsqu'il a lieu, de la vapeur d'eau d'abord, puis de l'air ensuite, envahissent tout le conduit qui est alors embolisé. Une fois l'air à pression atmosphérique, le conduit embolisé n'est plus fonctionnel. Néanmoins, la structure intrinsèque des conduits vasculaires ainsi que la forte cohésion des molécules d'eau contribuent très largement à limiter les risques de cavitation dans des conditions normales de fonctionnement. Dans un chapitre suivant (III),

nous verrons dans quelles conditions cet événement de cavitation peut survenir et quelles en sont les conséquences.

(v) L'arrêt du processus de transpiration entraîne l'arrêt de la circulation ($\Delta\psi=0$). Le potentiel hydrique est alors le même dans toutes les parties de la plante. En considérant cet équilibre comme parfait, le potentiel hydrique de la plante équivaut alors à celui du sol : ce potentiel est appelé potentiel hydrique de base. A noter que si le sol n'est pas saturé en eau ($\psi_{\text{sol}} < 0$), la sève brute restera sous tension, malgré l'absence de flux.

Cette théorie expliquant l'ascension de l'eau est appelée " Tension-Cohésion " car :

1- la force motrice à l'origine du flux est générée par les tensions capillaires en réponse à la vaporisation de l'eau.

2- La cohésion des molécules d'eau entre elles, grâce à des liaisons hydrogènes, permet le développement des tensions depuis les racines jusqu'aux feuilles, sans qu'il n'y ait, sauf cas exceptionnels, rupture de la colonne d'eau.

II.4 L'architecture hydraulique.

L'architecture hydraulique d'une plante est une description quantitative, définie grâce à un modèle linéaire simple d'éléments conducteurs en utilisant l'analogie à la loi d'Ohm. Tout comme un courant électrique prend naissance dans un circuit de résistances aux bornes duquel est appliquée une différence de potentiel, la sève se déplace à travers la plante, du sol jusqu'à l'atmosphère, grâce à l'existence d'une différence de potentiel hydrique entre racines et feuilles, entretenue par la transpiration. La conductivité hydraulique de l'arbre est définie comme la conductance équivalente à toutes les conductances en phase liquide du système sol-plante.

La *conductance hydraulique* d'un segment (K : $\text{mol s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$) peut être calculée comme étant le ratio entre le flux à travers ce segment (E_s) et la différence de potentiel hydrique entre les deux extrémités ($\Delta\psi$) :

$$K_h = \frac{E_s}{\Delta\psi}$$

Elle peut être déterminée directement par le système HPFM (High Pressure Flow Meter) qui mesure le flux d'eau traversant un segment de tige donné en réponse à une différence de potentiel stable appliquée entre ces deux extrémités. Cette conductance dépend

de la longueur du segment. Ainsi, elle peut être exprimée par unité de longueur du segment mesuré comme la conductivité hydraulique (K_h : mol m s⁻¹ MPa⁻¹) :

$$K_h = \frac{E_s \times L}{\Delta \Psi}$$

Où L (m) est la longueur du segment étudié. Comme K_h dépend de la surface de section de la tige (A_s , m²), la conductivité hydraulique exprimée en fonction de la section du segment de tige permet d'obtenir la conductivité spécifique de la tige. Elle traduit la capacité d'un élément de longueur et de section unitaires à conduire un flux hydrique. Toutefois, chez les plantes ligneuses, la partie centrale de la tige (bois de cœur) est non conductrice et on exprime la conductivité par unité de surface de xylème fonctionnel (bois d'aubier) (A_s , m² sapwood) afin d'obtenir la conductivité spécifique du bois d'aubier (K_s : mol m⁻¹ s⁻¹ MPa⁻¹) :

$$K_h = \frac{E_s \times L}{\Delta \Psi} \cdot \frac{1}{A_s} = \frac{K_h}{A_s}$$

Au niveau des feuilles, le trajet vasculaire est interrompu et l'eau circule de manière extra-vasculaire entre les nervures (xylème) et les cavités sous stomatiques. La question du trajet de l'eau dans cette partie foliaire du circuit sol-atmosphère demeure l'objet d'hypothèses.

La transpiration s'effectue à plus de 90% par l'ostiole des stomates, suivant le gradient de concentration de vapeur d'eau entre les espaces intercellulaires (W_i) et l'atmosphère (W_a). A l'échelle foliaire, la loi de Fick simplifiée décrit la diffusion de la vapeur d'eau au niveau des stomates et la vitesse de transpiration foliaire (E_L : mmol m⁻² s⁻¹) comme le produit de la différence de concentration en vapeur d'eau entre les espaces intercellulaires et l'atmosphère ($W_i - W_a$: mmol H₂O mol air⁻¹) et la conductance de surface pour la vapeur d'eau, souvent assimilée à la conductance stomatique (g_s : mmol H₂O m⁻² feuille s⁻¹) :

$$E_L = g_s \cdot (W_i - W_a)$$

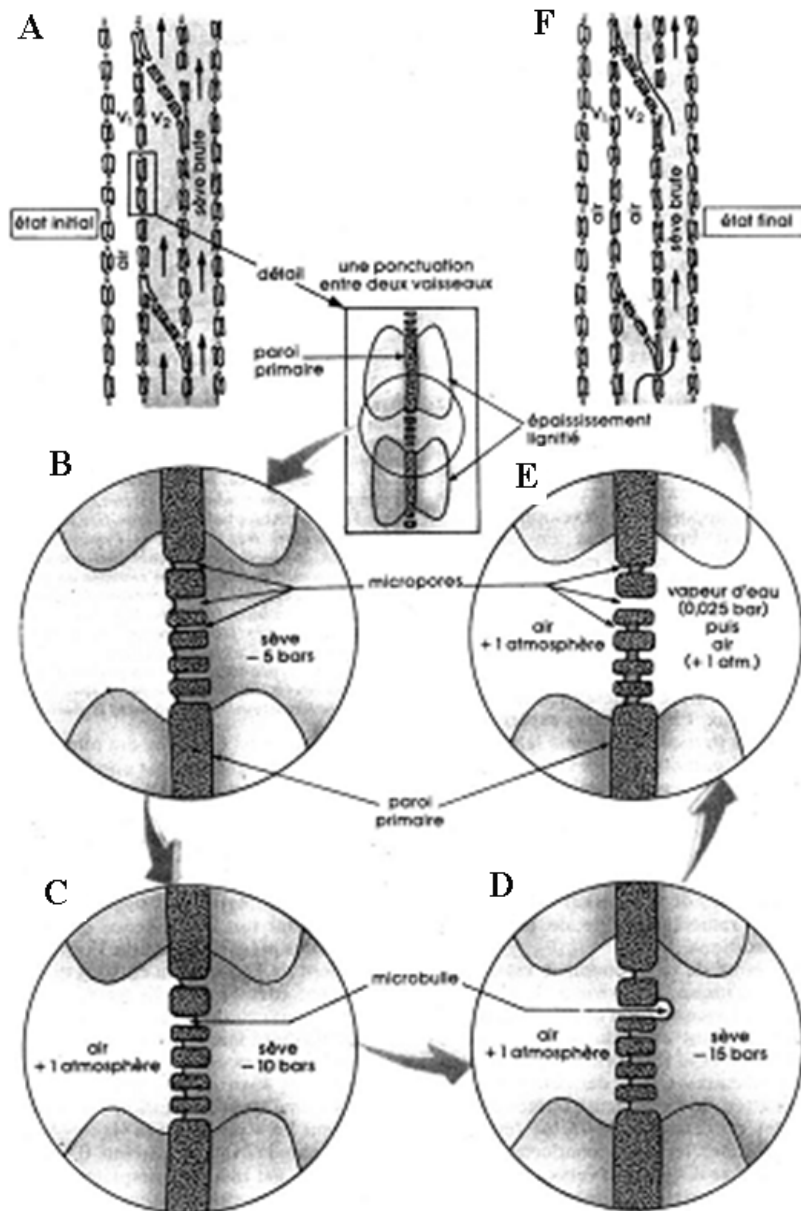


Fig. 16 : Mécanisme de cavitation des vaisseaux du xylème selon l'hypothèse du "germe d'air". A) modèle structural des vaisseaux du xylème. Le vaisseau V1 est plein d'air à pression atmosphérique et le vaisseau V2 est fonctionnel et rempli de sève sous tension. B, C, D, E) Grossissements de la zone des ponctuations montrant les étapes du passage d'air entre deux vaisseaux. F) modèle structural des vaisseaux du xylème montrant les vaisseaux V1 et V2 remplis d'air.

III- La cavitation du xylème

III.1 Mécanismes de la cavitation.

La cavitation peut se produire dans deux situations: les cycles de gel-dégel en hiver et le stress hydrique en été; et il existerait des interactions entre les deux. Le processus de cavitation induit par un stress dû au gel dans les arbres a été bien documenté, c'est un phénomène annuel qui touche la plupart des espèces d'arbres feuillus des régions tempérées. Automnale, hivernale ou printanière, elle est plus fréquente que l'embolie estivale et résulte de l'alternance de gel et dégel quand l'arbre est dépourvu de feuilles (Cochard et Tyree, 1990). Quand la sève gèle, les gaz dissous qu'elle contient sont expulsés, car ils sont très peu solubles dans la glace. Au moment du dégel, ces bulles se dissolvent à nouveau dans la sève ou elles obstruent le vaisseau (Sperry, 1993). Plus les bulles d'air sont volumineuses, moins elles se dissolvent. La cavitation liée au gel-dégel est influencée par le diamètre des vaisseaux conducteurs: plus ils sont larges, plus les bulles qui se forment ont des chances d'être grosses et donc plus l'embolie est probable.

La cavitation induite par le stress hydrique en été se produit dans des conditions différentes car la sève est sous tension et elle circule. Trois processus distincts peuvent conduire à la cavitation liée au stress hydrique: 1) une rupture dans le corps de la colonne d'eau par la perte de cohésion entre les molécules d'eau, 2) une rupture à l'interface de la paroi par la perte d'adhérence de l'eau sur les parois (Pickard, 1981), 3) l'aspiration d'une bulle d'air sous pression atmosphérique et contenue dans un autre compartiment. L'explication qui paraît aujourd'hui la plus probable est la troisième qui repose sur l'hypothèse dite du « germe d'air » (Zimmerman 1983). Pour la comprendre il faut revenir sur la structure fine d'un élément conducteur (Fig. 16). Ces éléments se présentent comme de très fins capillaires (20 à 200 μm) aux parois rigidifiées par des dépôts de lignine imperméable. Ces derniers sont cependant interrompus de place en place par des ponctuations. C'est à leur niveau que surviendrait la cavitation dans l'appareil conducteur. La figure 16 schématise les étapes du processus. Lors de la situation initiale, le vaisseau V1 est plein d'air et le vaisseau V2 est fonctionnel (A, en haut). Supposons que la tension de la sève soit de -0.5 MPa . Au niveau des ponctuations, voies de passage de la sève d'un élément conducteur à un autre, des ménisques à l'interface air-sève se forment. Au fur et à mesure que la tension de la sève s'accroît, passant par exemple de -0.5 MPa à -1.0 MPa , quand la transpiration augmente et que le rameau tend à se dessécher, les ménisques se creusent de plus en plus (C). Nous pouvons relier le rayon du

ménisque à la différence de pression par la loi de Laplace : ($P_{sol} = 2\gamma / r$), avec γ : la tension superficielle exercée à l'interface l'eau-air et r : le rayon courbure du ménisque.

Lorsque la limite de résistance de ces ménisques, déterminée par le rayon du pore le plus large, est atteinte, une microbulle apparaît, enfle et envahit tout l'élément conducteur (D et E). Celui-ci est alors rempli de vapeur d'eau ; la pression y est alors celle de la vapeur saturante de l'eau à la température de l'élément (≈ 0.0025 MPa). Comme la pression dans V1 est celle de l'air, de l'air pénètre dans V2 dont la pression va s'établir elle aussi à la pression atmosphérique. Le vaisseau V2 est alors embolisé. Il est alors non plus rempli de vapeur d'eau comme juste après la cavitation, mais rempli d'air. Ce « bouchon d'air » rend donc le vaisseau non fonctionnel pour la conduction de la sève.

Certains travaux de recherche ont conforté l'hypothèse du "germe d'air" proposée par Zimmerman (1983). Cochard et al. (1992) ont utilisé une pression positive pour induire ce "germe d'air" et établir les courbes de vulnérabilité. Ils ont obtenu des courbes de vulnérabilité déterminées par trois méthodes différentes sur les branches de saules (*Salix alba*) et le peuplier (*Populus deltoides*). Dans cette étude, les auteurs montrent que la tension du xylème n'est pas nécessaire pour induire la perte de conductivité de la tige, et qu'elle peut aussi être induite en injectant de l'air sous pression à un rameau dont la sève est à pression atmosphérique (négligeable) à l'aide d'une chambre à pression. La perte de conductance est observée pour les mêmes valeurs absolues de pressions positives d'air ou de tension de sève, suggérant que le mécanisme de perte d'embolie est le même dans les 2 situations. Ainsi, c'est bien la différence de pression entre un compartiment rempli d'air et un compartiment rempli de sève qui génère ce germe d'air.

D'après cette hypothèse du germe d'air, les propriétés biochimiques et structurales de la ponctuation seraient donc déterminantes dans le phénomène de la cavitation. Ainsi, l'hypothèse du germe d'air repose aussi sur l'association entre une plus faible vulnérabilité à la cavitation avec une faible conductivité hydraulique (Zimmermann, 1983; Sperry et Hacke, 2004). Ce compromis entre l'efficacité et la sécurité du xylème serait lié à la porosité de la paroi de la ponctuation (Choat et Pittermann, 2009). Par ailleurs, de nombreuses études en microscopie électronique à transmission ont montré une corrélation entre la porosité de la paroi de la ponctuation et la vulnérabilité à la cavitation (Sperry et Tyree, 1988 ; Sperry et al., 1991 ; Alder et al., 1996 ; Harvey et Van den Driessche, 1997).

Les différents composants de la paroi de la ponctuation sont autant de candidats possibles pour influencer sur la vulnérabilité à la cavitation. Rappelons que la paroi de la ponctuation est de type pecto-cellulosique (paroi primaire), et qu'elle serait donc constituée de

cellulose, d'hémicellulose et de pectines, voire de lignines. Les microfibrilles de cellulose sont incluses dans une matrice des polysaccharides de pectines très hydratée (Dickson, 2000). Les caractéristiques structurelles telles que l'épaisseur de la paroi de ponctuation, la porosité et les propriétés mécaniques sont probablement des déterminants importants de la résistance de cavitation (Jansen et al., 2009). Les pectines capable de réticulation par le calcium seraient particulièrement fréquentes dans les parois des ponctuations aréolées (Chaffey et al., 1997; Hafren et al., 2000). En outre, les pectines liées au calcium ont une influence sur l'élasticité de la paroi (Ezaki et al., 2005; Proseus et Boyer, 2006; Derbyshire et al., 2007), et peut ainsi influencer les propriétés d'étirement des parois de ponctuation et, par conséquent, le mécanisme de cavitation. Herbette et Cochard (2010) ont démontré que le calcium contrôle la vulnérabilité à la cavitation, et ils proposent que ce contrôle se fasse en agissant sur les propriétés d'étirement de la paroi de la ponctuation.

Une étude récente a montré qu'il existe une relation positive entre l'aire des ponctuations par vaisseau et la vulnérabilité à la cavitation (Wheeler et al., 2005). Plus les ponctuations sont présentes, plus le vaisseau est vulnérable au germe d'air (Christman et al., 2009). Cette hypothèse appelée " rare pit " expose que les ponctuations avec des pores de taille favorable au germe d'air sont très rares, contrairement aux ponctuations majoritaires qui présentent des pores imperméable à l'air (Hargrave et al., 1994; Choat et al., 2003; Wheeler et al., 2005). Pour cette raison, la vulnérabilité d'un vaisseau est fortement influencée par l'air de paroi des ponctuations: plus la surface de paroi des ponctuations sont grande, plus la probabilité que le vaisseau contient une ponctuation vulnérable est élevée. L'hypothèse repose sur:

- la rareté des pores de taille favorable au "germe d'air" dans la paroi des ponctuations,
- le manque de corrélation entre la taille moyenne des pores de la paroi et la vulnérabilité à la cavitation,
- la corrélation significative entre l'aire des ponctuations inter-vasseaux et la vulnérabilité à la cavitation (Hargrave et al., 1994; Choat et al., 2003; Wheeler et al., 2005; Hacke et al., 2006, Jansen et al., 2009).

Une autre étude suggère que la vulnérabilité à la cavitation n'est pas déterminée par la taille des pores intrinsèque à la construction des parois des ponctuations (Choat et al., 2003). Elle serait liée à l'existence d'événements rares, tel que de grands pores résultant de parois faibles ou endommagés. Toutefois, ils ont trouvé que la porosité de la paroi de la ponctuation est corrélée avec la vulnérabilité à la cavitation, sur 4 espèces testées. Les espèces les plus résistantes à la cavitation avaient le plus faible diamètre de pores.

III.2 Résorption de l'embolie.

Des études ont montré qu'une augmentation de la pression de la sève est indispensable à la résorption de l'embolie (Ewers et al., 2001), car l'augmentation de la pression favorise la dissolution des bulles. Une telle augmentation n'est possible qu'en l'absence des feuilles, quand la sève n'est pas tirée par le haut. Les études sur la résorption d'embolie ont donc surtout concerné l'embolie liée au gel-dégel. L'origine de la mise sous pression de la sève dépend de la saison: au printemps et en automne, elle résulte de la pression racinaire, née de la différence de pression osmotique entre la solution du sol, peu concentrée, et celle de la sève brute qui l'est plus. En l'absence de transpiration, un flux d'eau du sol vers les racines repousse l'eau dans l'appareil vasculaire, jusqu'aux branches (la pression est de l'ordre de quelques bars).

En hiver, le phénomène, étudié depuis une dizaine d'années sur le noyer (Améglio et al., 2002), est tout autre. Dans cette essence, la sève des branches est en alternance sous pression ou sous tension, selon la température de l'air: lorsqu'elle est supérieure à 5°C, la sève est sous tension ; quand elle est inférieure, la sève est sous pression. Cette pression hivernale résulte de l'hydrolyse des réserves d'amidon des branches en sucres solubles. Ces derniers passent dans la sève brute et créent un appel d'eau des tissus voisins vers les vaisseaux où la sève est alors mise sous pression, entraînant une dissolution au moins partielle des bulles d'air des vaisseaux. Ainsi, chez le noyer en l'absence de feuilles, la sève est le plus souvent sous une pression due soit à la poussée racinaire, soit à l'hydrolyse de l'amidon des branches.

À l'inverse de l'embolie hivernale, l'embolie estivale n'est généralement pas résorbée (Cordero et Nilsen, 2002). Quand la transpiration augmente, la pression (négative) dans les vaisseaux diminue. Lorsque cette pression est trop négative, le seuil de la cavitation peut être atteint. La perte de conduction, c'est-à-dire l'augmentation de résistance à la propagation de la sève, qui en résulte impose à la pression de diminuer encore pour maintenir la même transpiration: la cavitation s'emballe jusqu'à une embolie générale et donc, la mort de l'arbre. Cependant, les arbres sont dotés de mécanismes qui empêchent ce scénario catastrophique: ils maintiennent la tension à des valeurs inférieures à celle du seuil de la cavitation.

Il est bien admis qu'il existe un contrôle stomatique de la cavitation. Le seuil de tension pour lequel les stomates se ferment est relié au seuil de tension pour lequel commence la cavitation (Cochard et al., 2002 ; Lemoine et al., 2002 ; Cochard, 2002a ; Cochard et al., 1996). Ainsi, les stomates sont les garants de l'intégrité de l'appareil vasculaire des arbres. Les

courbes de vulnérabilité indiquent les gammes de tensions pour lesquelles les échanges gazeux sont assurés.

En plus de ce mécanisme d'évitement, Holbrook et Zwieniecki (1999), affirment qu'il existe une résorption de l'embolie, et ils présentent un mécanisme d'élimination de l'embolie des vaisseaux. L'embolie des vaisseaux est un phénomène réversible en fonction de l'interaction entre le parenchyme du xylème, la chimie de la paroi des vaisseaux et la géométrie des ponctuations inter-vaisseaux (Zwieniecki et Holbrook, 2009).

III.3 Résistance à la cavitation

III.3.1 Sécheresse et résistance à la cavitation

Les modifications climatiques annoncées vont avoir un impact certain sur l'état hydrique des arbres, pouvant conduire à leur mort, en particulier en cas d'accentuation des épisodes de sécheresses extrêmes. La résistance à la sécheresse des arbres est conférée par de nombreux traits physiologiques liés à la tolérance à la dessiccation ou à l'évitement (Chaves et al., 2003). La transpiration est la force motrice pour le transport de l'eau, et selon la théorie de " Tension- Cohésion " (Cochard et al., 2001), elle tire l'eau du sol vers les feuilles le long d'un continuum de potentiels hydriques ($\Delta\psi$) décroissants. La pression dans les vaisseaux du xylème dépend des potentiels hydriques du sol et de l'atmosphère, et elle peut être très négative (tension typiquement de -1 MPa à -3 MPa) et donc dans un état physique métastable. Lorsque la teneur en eau du sol diminue au cours d'une sécheresse, cette tension est exacerbée. L'arbre peut contrôler cette tension en limitant les pertes d'eau par la fermeture des stomates. Cependant, au cours d'une sécheresse extrême, la tension de la sève peut dépasser une valeur seuil qui rompt la colonne d'eau dans les vaisseaux du xylème (c'est le processus de cavitation). Les vaisseaux remplis d'air sont alors embolisés et deviennent non fonctionnels. L'alimentation hydrique des parties supérieures de l'arbre n'est alors plus assurée, affectant les métabolismes de l'arbre, puis entraînant une mortalité prématurée des organes non irrigués et finalement la mort de l'arbre. Les espèces ou génotypes résilients à la sécheresse doivent pouvoir maintenir des vaisseaux du xylème fonctionnels afin de maintenir les tissus irrigués, en évitant le processus de cavitation de ces vaisseaux. De fortes corrélations existent entre la vulnérabilité à la cavitation du xylème et la distribution des espèces vis-à-vis de la disponibilité en eau (Maherli et al., 2004 ; Tissier et al., 2004). Cette corrélation suggère fortement que la vulnérabilité puisse être un caractère adaptatif de tolérance aux sécheresses extrêmes.

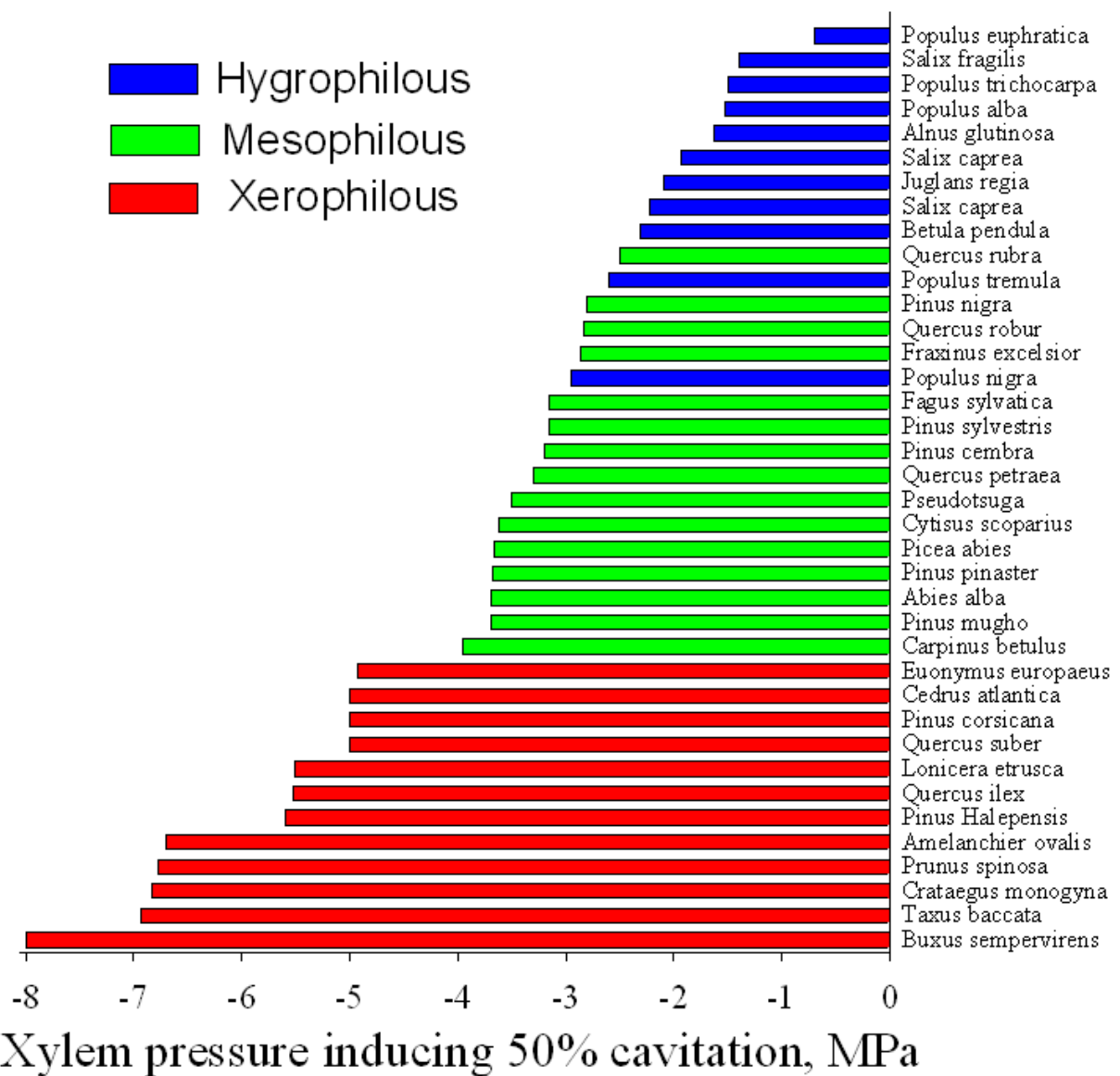


Fig. 17: Valeurs de P50 de 38 espèces ligneuses différentes. Les espèces choisies présentent des besoins en eau différents et sont ainsi classé en 3 groupes: Hygrophiles (bleu), Mésophiles (vert) et Xérophiles (rouge).

III.3.2 Variabilité de la résistance à la cavitation

Les travaux de la littérature montrent que la vulnérabilité à la cavitation varie considérablement, et à différents niveaux de comparaison: entre espèces ou au sein d'une même espèce. La variabilité intraspécifique peut être d'origine génétique (différence entre génotypes), ou liée à une plasticité phénotypique, selon l'organe, la phénologie ou les conditions environnementales.

III.3.2.1 Variabilité inter-spécifique

Un grand nombre de courbes de vulnérabilité à la cavitation estivale sont aujourd'hui publiées. Parmi les espèces ligneuses les plus vulnérables à la cavitation, on compte les peupliers (Cochard et al., 1996; Harvey et Van Den Driessche, 1997, 1999; Cochard, et al., 2007), les saules (Cochard et al., 1992), le noyer (Tyree et al., 1993 ; Cochard et al., 2000b), le maïs (Cochard, 2002a) et un arbre tropical *Clusia uvilanii* Pittier (Zotz et al., 1994), toutes des espèces sensibles à la sécheresse. Pour ces espèces, la pression seuil de cavitation se situe entre -1 et -2MPa. Parmi les espèces moins vulnérables, on trouve des chênes méditerranéens (Tyree et Cochard, 1996) ou des cèdres (Cochard, 1992) avec des valeurs seuils de cavitation inférieures à -4MPa. De nombreuses espèces montrent des pressions seuils d'embolie entre -2 et -4 MPa, comme le hêtre (Cochard et al., 1999 ; Lemoine et al., 1999), les frênes (Cochard et al., 1997) et les conifères tempérés (Cochard, 1992 ; LU et al., 1996). Pour les espèces les moins vulnérables, des valeurs de P50 (pression induisant 50% de perte de conductance) inférieures à -10 MPa ont été rapportées pour certaines espèces de *Juniperus* (Pockman et Sperry 2000). La caractérisation d'un nombre d'espèces provenant d'habitats très contrastés a permis de mettre en évidence que les espèces xérophiles possédaient des valeurs de P50 plus faibles que les espèces mésophiles et plus faible encore que les espèces hygrophiles (Maherali et al., 2004 ; Pockman et Sperry, 2000 ; Tyree et al., 2003). Les seuils de vulnérabilité à la cavitation correspondent assez bien avec la notion empirique de tolérance à la sécheresse au niveau inter-spécifique (Fig. 17). Il est donc fort probable que la vulnérabilité à la cavitation soit un trait soumis à sélection compte tenu de son importance fonctionnelle pour le maintien d'une balance hydrique favorable.

III.3.2.2 Variabilité intra-spécifique.

Cet aspect est beaucoup moins documenté que la variabilité inter-spécifique. En général, la gamme de variabilité observée pour la vulnérabilité à la cavitation en intra-spécifique est plus faible que celle observée en inter-spécifique (généralement entre 1 et 2 MPa). Bien que les données au niveau intra-spécifique soient moins nombreuses que celles au niveau inter-spécifique, elles sont amenées à s'accroître considérablement dans les prochaines années. Ces études intra-spécifiques seront développées pour répondre à certaines questions fondamentales: comment est structurée la variabilité dans les populations naturelles? La vulnérabilité à la cavitation est-elle un trait adaptatif? Quelles sont la part et la nature du contrôle génétique de vulnérabilité à la cavitation? Est-il possible d'utiliser la vulnérabilité à la cavitation comme critère de sélection de géotypes tolérants à la sécheresse pour des espèces d'intérêt agronomique ou forestier ? Dans les parties ci-dessous, nous dresserons un état de l'art des connaissances sur cette variabilité inter-spécifique.

III.3.2.2.1 Variabilité génétique.

Des résultats de la littérature montrent que la variabilité de la vulnérabilité du xylème à la cavitation existe à un niveau intra-spécifique, entre géotypes (Neufeld et al., 1992) ou provenances géographiques d'un même taxon (Franks et al., 1995 ; Ladjal, 2005). Cochard et al. (2007) ont montré une variabilité de la résistance à la cavitation entre 5 clones de peuplier (*Populus spp.*) et 4 clones de saules (*Salix spp.*) Cette variabilité est plutôt faibles avec 0.12 MPa pour les clones de peuplier (SE = 0,04, n = 5), et 0.04 MPa pour les clones de saule (SE = 0,01, n = 4). Cochard (2002a) a aussi étudié la vulnérabilité à la cavitation de quatre géotypes de maïs (*Zea maïs*), et Ennajeh et al. (2008) ont montré une variabilité de la résistance à la cavitation entre des oliviers (*Olea europaea* L.) de variétés "Meski" et "Chemlali".

III.3.2.2.2 Plasticité phénotypique.

La vulnérabilité à la cavitation serait une caractéristique intrinsèque du tissu conducteur, puisqu'elle serait dépendante de l'ultra-structure des ponctuations. Comme pour tout trait structural, il en résulte qu'une modification des conditions environnementales prévalentes entraînerait un ajustement de la vulnérabilité à l'embolie estivale. L'effet de la lumière est probablement le mieux documenté (Cochard et al., 1999 ; Barigah et al., 2006). Les branches développées sous pleine lumière sont moins vulnérables à la cavitation que les branches d'ombre. Cette différence liée à l'exposition peut s'expliquer du fait que des valeurs

d'irradiance plus fortes s'accompagnent généralement d'une demande évaporative plus forte, et donc de tensions plus fortes au sein du xylème; la mise en place d'un xylème moins vulnérable est donc nécessaire afin de pallier les risques éventuels d'embolie.

La vulnérabilité à la cavitation du xylème a également été montrée pour s'acclimater à la disponibilité des nutriments du sol (Harvey et Van Den Driessche, 1999). Cependant, la capacité de s'acclimater à la disponibilité en eau reste à démontrer bien qu'elle ait déjà été explorée, notamment chez des espèces résistantes à la sécheresse (Beikircher et Mayr, 2009; Ladjal et al., 2005).

III.3.2.2.3 Variabilité entre organes.

La vulnérabilité à la cavitation varie au sein d'un même individu en fonction des organes considérés: pétiole, tige ou racine. L'idée que les pétioles seraient plus vulnérables que la tige a d'abord été énoncée par Zimmermann (1983) et fait référence à l'hypothèse de segmentation hydraulique. Les feuilles correspondant aux zones où les tensions xylémiennes sont les plus fortes dans la plante, ce sont elles qui souffriront des premiers événements de cavitation lorsque la tension seuil sera atteinte. Sous cette hypothèse, les parties non pérennes (les feuilles) sont donc sacrifiées au profit des parties pérennes (tiges et racines) représentant l'investissement carboné le plus important. Tyree et al. (1993) ont conforté cette hypothèse quand ils ont soumis un noyer (*Juglans regia* L.) à la sécheresse : ils n'ont pas obtenu de différences dans les valeurs de potentiel hydrique entre les feuilles et les tiges ($-1.9 \text{ MPa} \pm 0.1$) et ($-1.9 \text{ MPa} \pm 0.1$), mais ils ont obtenus des différences significatives entre le PLC pour les tiges ($14\% \pm 3$) et les pétioles ($87\% \pm 4$). D'autres études sur peuplier ne l'ont pas confirmée (Cochard et al., 1996; Hacke et Sauter, 1996). Dans la première étude, aucune différence dans la vulnérabilité à la cavitation n'avait pu être détectée entre les pétioles et les entrenœuds, alors que dans la seconde étude, les pétioles étaient plus résistants que les branches et les branches étaient plus résistantes que les racines. Le cas des racines est moins débattu car un grand nombre de courbes de vulnérabilité ont été construites sur des racines et montrent que ces dernières sont plus vulnérables que la tige (Sperry et Saliendra, 1994; Alder et al., 1996; Hacke et Sauter, 1996 ; Alder et al., 1997; Maherali et al., 2006).

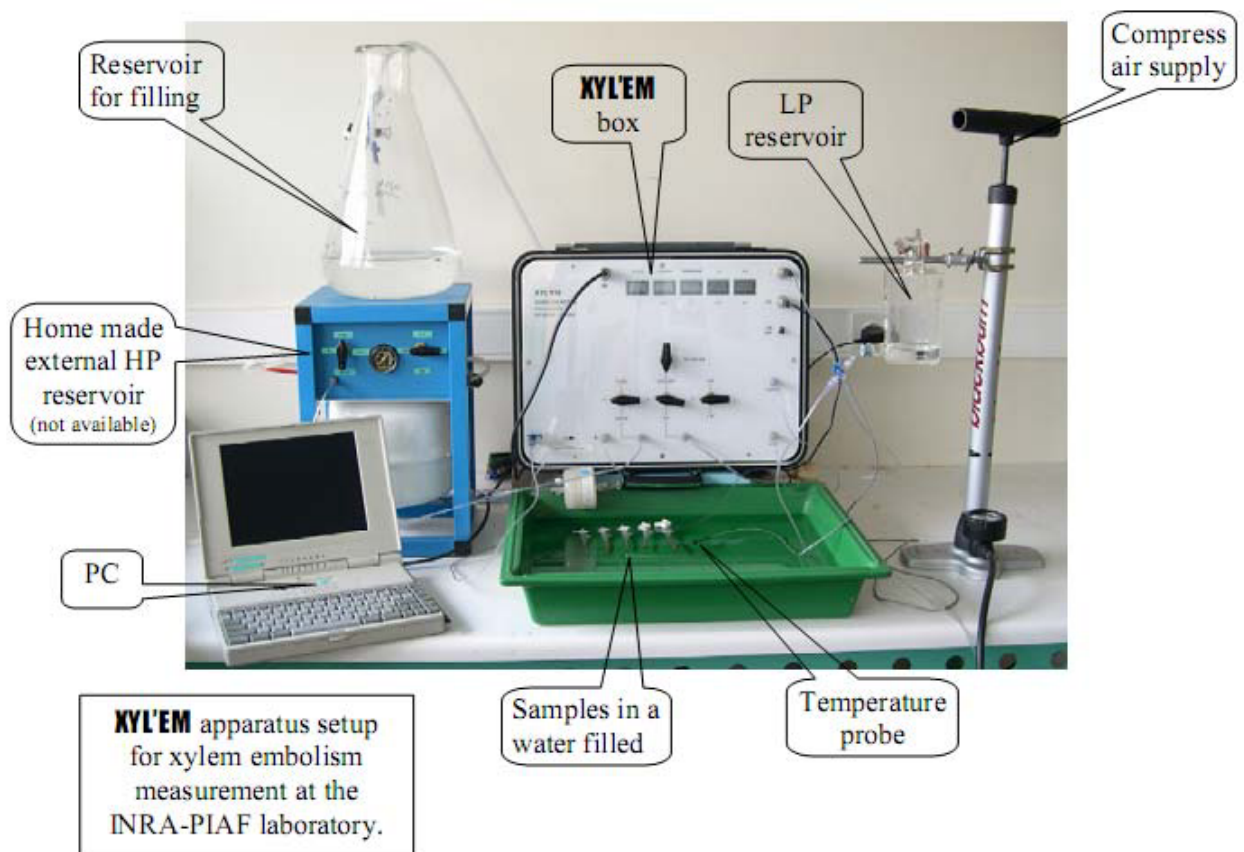


Fig. 18 : Présentation du XYL'EM® (Bronkhorst, Montigny-les-Cormeilles, France): appareil de mesure de la conductance et du taux d'embolie du xylème.

III.4 Les méthodes de mesure

III.4.1 Mesure du taux d'embolie

Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer les phénomènes de cavitation dans le xylème. La plus ancienne méthode, développée par Milburn et Johnson (1966) se base sur le fait que lorsqu'un élément cavite, les tensions se libèrent produisant une émission acoustique. Ces émissions acoustiques peuvent être détectées dans une large gamme de fréquences dans le domaine de l'audible à l'ultra sonique. Le nombre d'émissions est corrélé avec le nombre d'éléments conducteurs cavités. Cette technique est non destructrice mais très qualitative. Elle ne permet pas de mesurer l'impact sur la conductance du xylème. Une méthode plus récente repose sur une mesure hydraulique de l'embolie (Sperry et al., 1988). Lorsqu'un élément conducteur s'embolise, il devient inapte au transfert de l'eau, il en résulte une perte de conductivité hydraulique du rameau que l'on mesure. Cochard et al. (2000a) ont élaboré un nouvel appareil de mesure de la conductance du xylème et de l'embolie: le XYL'EM[®] (xylem embolism meter, Bronkhorst, Montigny-les-Cormeilles, France) (Fig. 18). La technique consiste à mesurer la conductance hydraulique des segments avant (conductance initial, K_i) et après désembolisation par pressurisation d'eau (conductance maximal, K_{max}). Une solution est perfusée à partir d'un réservoir à travers un segment de branche, maintenu sous l'eau pendant la mesure. Les mesures de K_i et K_{max} sont faites sous basse pression (6 kPa). Avant de pouvoir mesurer K_{max} , l'air qui obstrue les vaisseaux du xylème est éliminé par l'application d'une série de perfusions d'eau sous pression (0.15 MPa). Le niveau d'embolie est alors évalué par le pourcentage de perte de conductance (PLC, Percent Loss of Conductance) de la façon suivante :

$$PLC = (1 - k_i / k_{max}) \times 100$$

III.4.2 Mesure de la résistance à la cavitation.

La vulnérabilité à la cavitation d'un échantillon est classiquement estimée en établissant une courbe de vulnérabilité à la cavitation représentant la perte de conductance (PLC, %) en fonction de la valeur de pression du xylème (MPa). Une courbe de vulnérabilité à la cavitation (Fig. 19) présente un aspect sigmoïdal et comporte typiquement 3 phases distinctes. Au cours de la 1^{ière} phase, l'augmentation de la tension xylémienne ne provoque aucune variation significative de PLC jusqu'à une valeur seuil critique de pression. Au-delà de cette valeur seuil (phase 2), l'augmentation de la tension xylémienne entraîne une augmentation importante de PLC. La 3^{ième} phase est une perte de conductance plus lente allant jusqu'à la zone de rupture hydraulique totale (PLC = 100%).

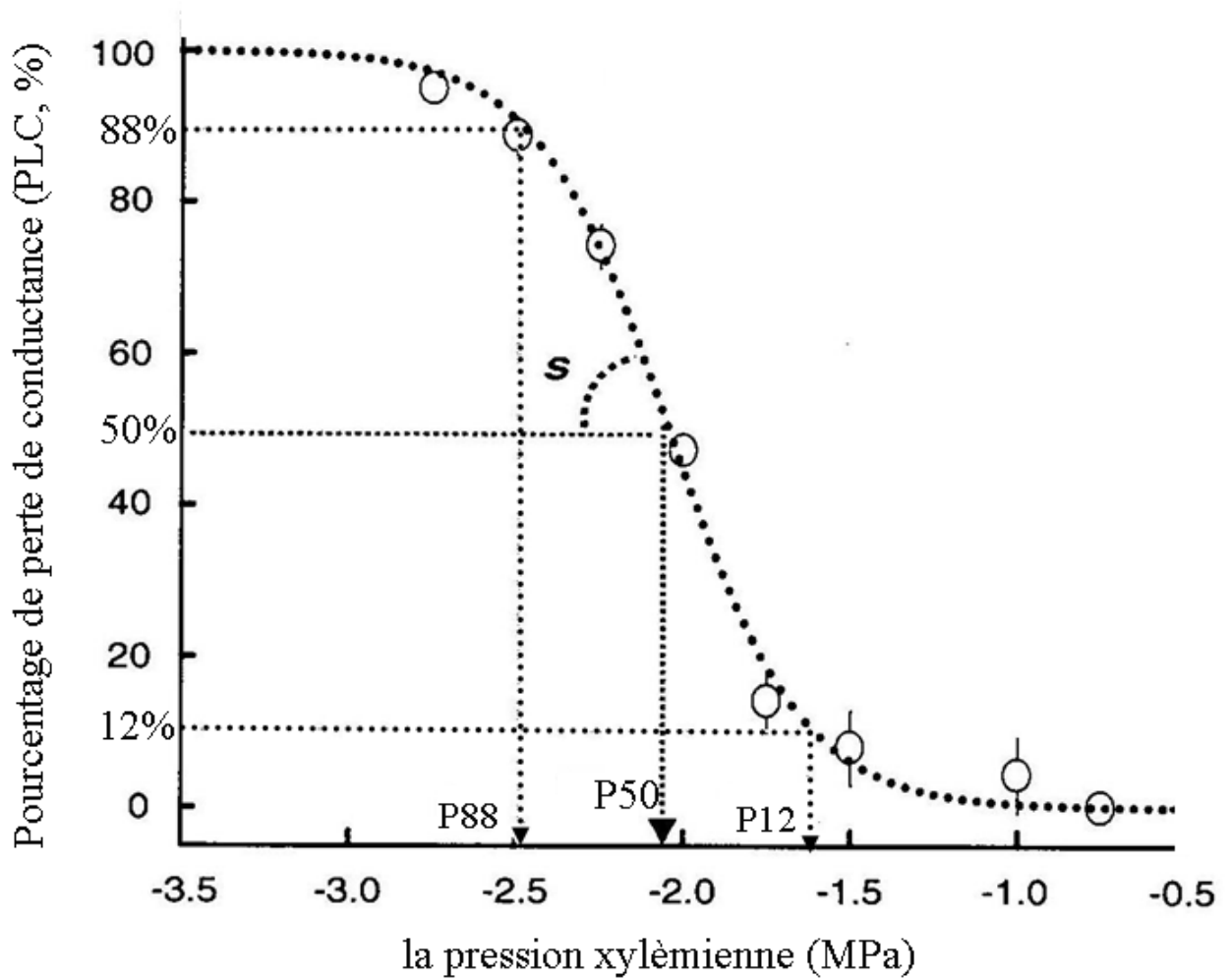


Fig. 19 : Exemple d'une courbe de vulnérabilité à la cavitation. La courbe de vulnérabilité représente le pourcentage de perte de conductance (PLC) en fonction de la pression du xylème (P). P50 représente la valeur de P entraînant 50% de PLC et s représente la pente de la courbe de vulnérabilité en ce point. Les courbes de PLC ont été ajustées par la fonction sigmoïde de Pammenter et van der Willigen (1998) : $PLC = 100 / (1 + e^{(s(P-P50)/25)})$. Le P12 est considéré comme le «point d'entrée d'air» (Sparks and Black 1999) et le P88 comme le «point complet d'embolie» (Domec and Gartner 2001).

Les courbes de vulnérabilité sont généralement très bien décrites par des fonctions logistiques. Le modèle le plus souvent utilisé et qui a été retenu dans cette thèse est celui de Pammenter et Vander Willigen (1998) :

$$PLC = 100 / (1 + e^{(s(P - P50) / 25)})$$

Où P représente la tension xylémienne, P50 représente la valeur de P entraînant 50% de PLC et *s* représente la pente de la courbe de vulnérabilité au niveau de P50.

D'autres paramètres ayant une signification physiologique particulière sont également déduits des courbes de vulnérabilité à la cavitation (le P12 et le P88). Le P12 se calcule selon l'équation: $P50 + 50 / s$; nous l'appelons le «point d'entrée d'air» (Sparks and Black, 1999). Il est interprété comme le niveau de tension du xylème à partir duquel la cavitation survient significativement, c'est-à-dire lorsque la résistance à l'entrée d'air par les ponctuations est surmontée (Tyree and Sperry, 1988). Le P88 se calcule selon l'équation: $P50 - 50 / s$; nous l'appelons le «point complet d'embolie» et il est interprété comme la tension minimale atteinte avant que le niveau d'embolie devienne critique (Domec and Gartner, 2001).

Afin de construire une courbe de vulnérabilité, des valeurs de PLC doivent donc être mesurées pour différents valeurs de tension xylémienne. Différentes techniques ont été développées pour mesurer cette vulnérabilité à la cavitation. La plus connue est la technique de déshydratation qui consiste à laisser déshydrater à l'air libre des lots de segments de xylème à différentes valeurs de tensions xylémiennes et ensuite mesurer la PLC par la méthode de mesure hydraulique avec le XYLEM[®] (Sperry et al., 1988). Cette technique est considérée comme celle de référence, se rapprochant le plus des conditions *in natura*. Cochard (2002b) a développé une nouvelle technique pour mesurer la résistance à la cavitation à l'UMR PIAF de Clermont-Ferrand : le CAVITRON (Fig. 20). Elle est adaptée de celle d'Alder et al. (1997) et repose sur l'utilisation de la force centrifuge pour générer des pressions hydrostatiques négatives au sein de l'échantillon. Les segments de tige de longueur et de diamètre calibrés (28 cm de long et 5 à 8 mm de diamètre) sont disposés sur un rotor dont la vitesse de rotation peut être contrôlée en temps réel. La tension au sein de l'échantillon peut alors être ajustée de façon précise (± 0.01 MPa) en ajustant la vitesse de rotation du rotor. La conductance hydraulique de l'échantillon ainsi que la PLC sont aussi mesurées en temps réel. Par conséquent, à l'aide de ce système, une courbe de vulnérabilité à la cavitation (Fig. 19) peut être établie à l'aide d'un seul échantillon en 45-60 min. Cette technique ne peut être utilisée sur des espèces possédant un grand nombre de conduits plus longs que les 28 cm de l'échantillon, au risque d'obtenir des courbes de vulnérabilité à la cavitation biaisées car représentatives seulement d'une sous-population de conduits ; c'est notamment le cas pour les

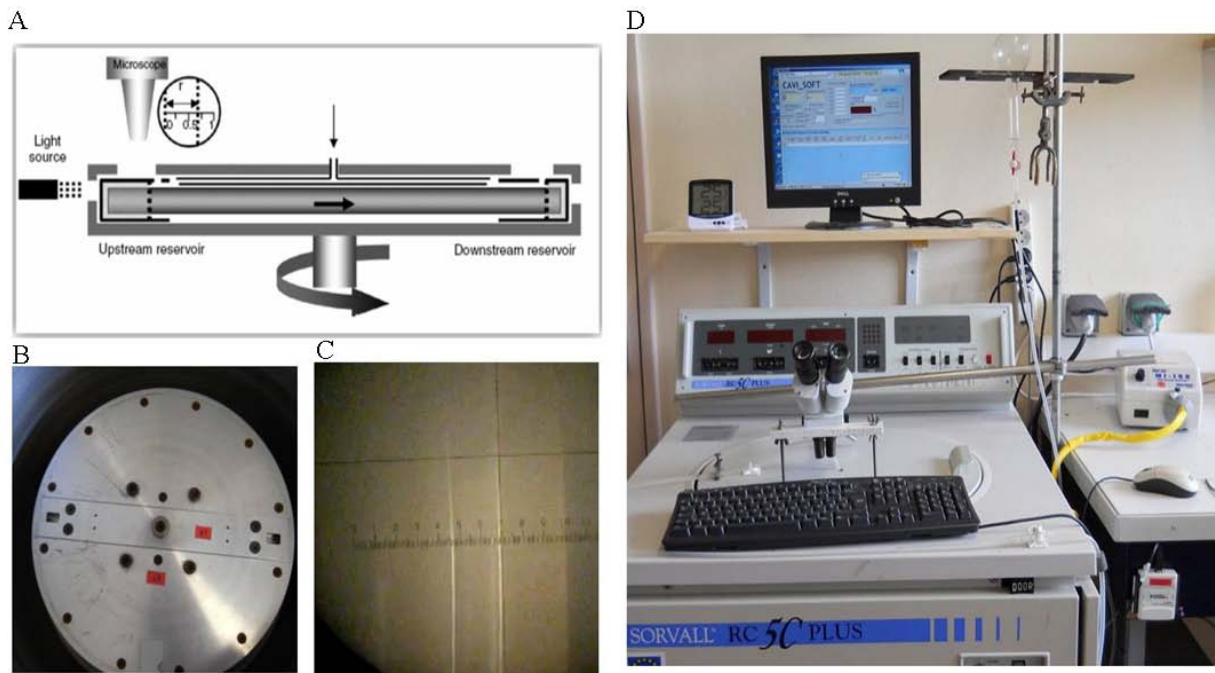


Fig. 20 : Présentation du CAVITRON, appareil permettant de mesurer la vulnérabilité à la cavitation d'un échantillon de tige. Il repose sur l'utilisation de la force centrifuge pour générer des pressions hydrostatiques négatives au sein de l'échantillon par la formule reliant la pression à la vitesse de rotation du rotor ($P = -0.5\rho\omega^2R^2$) (Cochard et al., 2002). A) Schéma illustrant le principe de fonctionnement du cavitron. L'échantillon est centré sur l'axe d'une centrifugeuse dont les extrémités sont immergées dans l'eau contenue dans deux réservoirs en plastique. B) Photo du rotor utilisé pour centrifuger les segments de tige. C) Photo d'une partie du rotor encours de rotation montrant les deux ménisques de niveau d'eau dans les 2 réservoirs. Le réservoir en amont diminue au fil du temps à une vitesse déterminée optiquement pendant la centrifugation en mesurant la variation de distance entre les ménisques en fonction du temps. D) Photo montrant un Cavitron complet avec le nouveau logiciel (CAVI-SOFT).

espèces présentant un bois à zone poreuse comme les chênes (*Quercus sp.*) et les frênes (*Fraxinus sp.*) (Cochard et al., 2005).

Une autre méthode hydraulique est basée sur l'utilisation de pressions positives pour induire de l'embolie ou générer des courbes de vulnérabilité. Sperry et Tyree (1990) ont montré, pour la première fois, l'intérêt d'utiliser des pressions pneumatiques positives pour induire de l'embolie. Leur technique consistait à injecter directement de l'air dans le xylème. Cette technique a été utilisée dans d'autres études, avec la pressurisation d'une branche entière dans une chambre à pression, avec la base à l'extérieur de la chambre (Cochard et al., 1992a,b; Cochard, 1992).

V Compromis entre la résistance à la cavitation et d'autres propriétés du bois.

V.1 Compromis entre résistance à la cavitation et d'autres propriétés hydriques.

La différence entre le potentiel hydrique critique, au-delà duquel le niveau d'embolie du xylème augmente fortement, et les valeurs minimales de potentiel au champ tend à être faible. Cette différence est considérée comme une marge de sécurité (Tyree et Sperry, 1988). Cette faible marge de sécurité suggère qu'il y a des inconvénients à avoir un xylème trop résistant à la cavitation. Le principal inconvénient serait que la résistance à la cavitation serait associée à une résistance au flux d'eau. Ainsi, la sureté hydraulique (résistance à la cavitation) se ferait au détriment de l'efficacité hydraulique (conductivité hydraulique). Le rôle des ponctuations à la fois dans le mécanisme de cavitation du xylème et dans sa conductivité hydraulique supporte l'idée d'un tel compromis. Bien que ce compromis est souvent évoqué dans la littérature, certaines études ne supportent pas l'existence de ce compromis (Cochard, 1992 ; Sperry et Sullivan, 1992 ; Sperry et al., 1994). Un tel compromis aurait d'importantes implications évolutives (Tyree et al., 1994).

Chez les angiospermes, la cavitation est censée se produire par l'aspiration d'une bulle d'air au niveau de la paroi des ponctuations d'un vaisseau rempli d'air vers un vaisseau rempli de sève sous tension (Zimmermann, 1983). D'après la loi de Young-Laplace, la différence de pression nécessaire à la cavitation est inversement proportionnelle au diamètre des pores de la ponctuation. Si cette hypothèse est correcte, le paramètre structural, qui détermine la vulnérabilité à l'embolie du xylème serait la porosité des ponctuations inter-vaisseaux et leur surface. Les ponctuations étant responsable de 50% de la résistance hydraulique du xylème

(Wheeler et al., 2005; Choat et al., 2006; Hacke et al., 2006), leur porosité et leur surface influerait grandement sur la conductance du xylème. Ainsi, la porosité de la surface de ponctuation serait proportionnelle à la conductance et à la vulnérabilité à la cavitation du xylème.

L'hypothèse de compromis entre l'efficacité hydraulique et la résistance à l'embolie du xylème a aussi des répercussions au sein des individus. Puisque le potentiel hydraulique diminue à partir du sol vers les feuilles, il serait raisonnable de s'attendre à un gradient de propriétés hydrauliques dans les plantes. Pour le fonctionnement hydraulique, l'embolie d'une certaine proportion de vaisseaux peut s'avérer être avantageux. L'embolie du xylème peut être considérée comme un mécanisme de contrôle, qui, dans le cadre de l'activité des stomates, régule la quantité d'eau extraite par les plantes (Salleo et al., 2000). Sous certaines conditions, une baisse de la conductivité du xylème liée à une embolie partielle peut permettre aux plantes de limiter les pertes d'eau (Sperry, 2000).

V.2 Compromis entre résistance à la cavitation et les propriétés du bois.

En plus des événements de la cavitation, les vaisseaux du xylème ont à résister à l'implosion sous pression négative en condition de sécheresse. Les paramètres structuraux qui contrôlent un tel effondrement implique les propriétés mécaniques transversale de la paroi cellulaire et la forme des vaisseaux du xylème : Plus le ratio de l'épaisseur de la paroi du vaisseau (t) sur le diamètre de la lumière (b) est élevé, plus le cylindre est mécaniquement résistant à l'effondrement transversale (Hacke et al., 2001; Cochard et al., 2004; Brodribb et Holbrook, 2005). En outre, les fibres de la matrice qui entoure les vaisseaux semblent également jouer un rôle prépondérant (Hacke et al., 2001; Jacobsen et al., 2005). Ainsi, la résistance à la sécheresse est positivement corrélée avec la densité du bois qui est fonction de l'épaisseur des parois, du diamètre de la lumière des fibres et vaisseaux, puis de la fraction du bois final. Ces propriétés peuvent aussi influencer sur les propriétés mécaniques du bois (Hacke et al., 2001; Niklas, 1997). Le soutien mécanique peut être amélioré au niveau des tissus par la diminution de la porosité du bois, l'agencement des couches de la paroi cellulaire ou encore la chimie de la paroi cellulaire (Gindl, 2001; Mencuccini et al., 1997; Jagels et al., 2003; Jagels et Visscher, 2006). Les tiges doivent aussi être mécaniquement résistantes pour faire face aux contraintes extérieures comme le vent. A l'échelle cellulaire, cette capacité est principalement dépendant des angles de microfibrilles de cellulose et de la densité du bois (Meylan et

Probine, 1969; Lindströmet al., 1998; Lichtenegger et al., 1999). Un nombre croissant d'études indique qu'il peut y avoir une relation entre la résistance aux stress hydrauliques et celle aux contraintes mécaniques. Ces interactions sont positives ou sont des compromis (Rosner et al., 2008, 2007; Utsumi et al., 2010). Certaines études ont trouvé un compromis entre la conductivité hydraulique et la résistance mécanique (Gartner, 1991a,b,c; Wagner et al., 1998; Jagels et al., 2003; Christensen-Dalsgaard et al., 2007), tandis que d'autres ont conclu que il n'y avait pas de compromis (Woodrum et al., 2003; Pratt et al., 2007; Rosner et al., 2007; Utsumi et al., 2010). Toutefois, les paramètres de sureté du xylème (résistances à la cavitation et à l'implosion) et la résistance mécanique ont toujours été jugés positivement corrélés (Rosner et al., 2008; Utsumi et al., 2010; Pratt et al., 2007), probablement parce que ces deux fonctions dépendent, au moins partiellement, de la densité du bois. Selon Pratt et al. (2007), la résistance mécanique de la tige, semble être important dans le maintien de transport d'eau sous pression négative et cela pourrait être une stratégie pour éviter l'effondrement des vaisseaux aussi bien que pour résister à des contraintes mécaniques causées par la gravité ou le vent. Cependant, les connaissances sur le contrôle génétique de la vulnérabilité à la cavitation et de la résistance à l'implosion font encore défaut. Une fois cet obstacle levé, il sera possible d'avancer sur les relations entre les fonctions hydrauliques et mécaniques du bois.

VI Le Peuplier.

VI.1 Biologie et écologie.

D'après la classification du groupe de phylogénie des Angiospermes (APG), le peuplier (genre *Populus*) fait partie du groupe des Angiospermes aux pollens triaperturés et il appartient à la famille des Salicacées. Le genre *Populus* est divisé en sections, niveaux taxonomiques situés entre le genre et l'espèce permettant de classer morphologiquement et écologiquement les 39 espèces de peupliers en 6 sections : Turunga, Leucoides, Aigeros, Tacamahaca, Leuce et Abaso. Les peupliers sont des arbres dioïques. Le génome de toutes les espèces de peuplier est composé de $2n = 38$ chromosomes, ce qui permet d'assurer un potentiel élevé de recombinaisons interspécifiques. Il présente aussi une variabilité génétique d'origines géographique et climatique, propice à la création variétale. Les peupliers les plus utilisés actuellement sont issus de trois espèces et de leur croisement:

-Le peuplier noir (*Populus nigra*) est originaire d'Europe; il est très plastique d'un point de vue stationnel, il a une croissance moyenne.

-Le peuplier deltoïde (*Populus deltoïdes*) est originaire de l'est de l'Amérique du Nord; il est de croissance rapide et il produit un bois de bonne qualité mais il nécessite des sols fertiles et travaillés.

-Le peuplier baumier (*Populus trichocarpa*) est originaire de l'ouest de l'Amérique du Nord; il a croissance moyenne et il est en revanche très plastique et fournit un bois de qualité moyenne.

La création de nouveaux cultivars par croisement de ces espèces permet de disposer d'arbres hybrides, qui possèdent les caractéristiques intéressantes de leurs parents tout en éliminant les caractères indésirables. Les critères recherchés lors de la création de nouveaux cultivars sont la rapidité de croissance, la rectitude des troncs, une plasticité vis-à-vis des stations de culture, un bois de bonne qualité, une faible sensibilité aux maladies, telles que les rouilles et la résistance au vent. Les cultivars utilisés en populiculture sont classés en deux grands ensembles: les euraméricains (*P. nigra* x *P. deltoïdes*) et les interaméricains (*P. deltoïdes* x *P. trichocarpa*).

VI.2 Intérêt économique.

La forêt mondiale représente 3870 mégahectares, dont 77 mégahectares sont occupés par des peupliers, plantations comprises. Les peuplements naturels représentent à eux seuls 70 mégahectares, dont 40% sont situés au Canada, 31% en Russie, 25 % aux Etats-Unis et 3% en Chine. Concernant les peupliers plantés, la Chine et l'Inde arrivent en tête des pays pratiquant la populiculture, avec respectivement 4,8 et 1 Mha de peupliers plantés. En Chine, 2 Mha sont dédiés à la production de bois et 2,8 Mha à la protection de l'environnement. Les surfaces plantées les plus importantes sont ensuite rencontrées en Europe (900 000 ha), avec la France (235 000 ha), la Hongrie (160 000 ha), la Roumanie (160 000 ha), la Turquie (130 000 ha) et l'Italie (120 000 ha). Actuellement, et du point de vue de la surface cultivée, la France est donc le 3ème producteur mondial de peupliers, après la Chine et l'Inde. Outre l'enjeu économique qu'ils représentent, les peupliers contribuent très efficacement au stockage du carbone. En effet, les arbres agissent comme des capteurs de gaz carbonique atmosphérique en emmagasinant le carbone lors des processus de photosynthèse. Or, bien qu'ils n'occupent que 2% du territoire forestier français, les peupliers assurent près du tiers de la récolte de bois feuillu commercialisé grâce à leur productivité importante. C'est presque autant que le chêne, qui occupe une surface forestière 20 fois plus importante.

VI.3 Intérêt scientifique.

Le peuplier est un bon modèle pour l'étude de la biologie des arbres forestiers. Il présente en effet une variabilité génétique considérable et des hybrides peuvent être obtenus facilement. De plus, la propagation végétative, aisée chez le genre peuplier, permet d'étudier différents génotypes et d'estimer les composantes génétiques et environnementales relatives à un caractère phénotypique d'intérêt. En Amérique du Nord et en Europe, le peuplier est par ailleurs l'arbre qui présente la croissance la plus rapide (Marron et al., 2006), ce qui permet d'effectuer une estimation des qualités de l'arbre adulte plus rapidement qu'avec d'autres espèces.

Certains génotypes de peupliers se prêtent à la culture in vitro et à la transformation par *Agrobacterium tumefaciens*. C'est notamment le cas du génotype 717-1B4 (*P. alba* x *P. tremula*), que nous utilisons à l'UMR PIAF. D'autres cultivars, notamment «Dorskamp», se développent très bien en culture hydroponique. Enfin, la taille relativement réduite du génome de peuplier ($2C=1,1$ pg et $2n=38$) a rendu possible son séquençage, achevé en 2005 sur l'espèce *trichocarpa* (Tuskan et al., 2006). Par ailleurs les outils informatiques et de génomique tendent à se développer, facilitant les études de biologie moléculaire.

Objectifs

A l'issue de cette synthèse bibliographique, il ressort que la vulnérabilité à la cavitation serait déterminante pour la tolérance des arbres à la sécheresse. Cette synthèse bibliographique révèle aussi une large variabilité inter-spécifique et que le mécanisme de cavitation au niveau des ponctuations est maintenant bien admis. Malgré les nombreuses études réalisées sur ce caractère, les informations sur sa variabilité à l'échelle intra-spécifique restaient insuffisantes et les bases moléculaires et génétiques étaient inconnues. L'objectif de ma thèse était donc d'analyser la variabilité de ce caractère chez le peuplier et d'identifier des gènes importants pour le contrôle de ce caractère.

Dans un premier volet, nous nous sommes donc intéressés à la plasticité phénotypique de ce caractère chez un clone de peuplier (*Populus tremula* × *Populus alba*, clone INRA 717-1B4). la plasticité phénotypique joue un rôle fondamental dans la capacité d'acclimatation des individus à l'environnement (Ackerly et al., 2000 ; Valladares et al., 2007). Le peuplier est une espèce pionnière qui est sensible au stress hydrique et vulnérable à la cavitation (Cochard et al., 2007) et les espèces pionnières sont connues pour s'acclimater aux changements environnementaux (Bazzaz 1979 ; Fetcher et al., 1983 ; Grime 1979). Ainsi, nous avons analysé la capacité de la vulnérabilité à la cavitation du peuplier à s'acclimater selon les conditions hydriques. Cette étude a été complétée par des analyses de la structure du xylème et des ponctuations qui visaient à rechercher les bases structurelles de cette acclimatation.

Le second volet de cette thèse portait donc sur la recherche de gènes impliqués dans le contrôle de la vulnérabilité à la cavitation. La recherche des gènes clefs de la vulnérabilité à la cavitation comporte plusieurs niveaux de difficulté et de complexité. C'est, sans doute, une raison expliquant l'absence d'études sur ce sujet lorsque la thèse a commencé. Aussi, la vulnérabilité à la cavitation étant totalement dépendante de la taille des pores au niveau de la paroi des ponctuations, le(s) mécanisme(s) d'acclimatation est à rechercher au niveau des facteurs contrôlant la mise en place de cette paroi et la formation des ponctuations. La composition de la paroi de la ponctuation d'un vaisseau de xylème est méconnue. La paroi présente classiquement une structure et une biochimie complexe car elle est composée de dérivés phénoliques, de polysaccharides et de protéines très variés avec différents agencements et interactions entre ces composants. Ensuite, les bases génétiques de ce métabolisme pariétal sont très complexes et encore méconnues. Pour des polysaccharides tels que les pectines ou encore les hémicelluloses, plusieurs enzymes ou protéines interviennent pour la synthèse des monomères, pour leur assemblage en polymères et pour des modifications de ces polymères une fois en place dans la paroi. Et ces protéines ou enzymes appartiennent souvent à des familles multigéniques. L'ensemble de ces difficultés d'étude

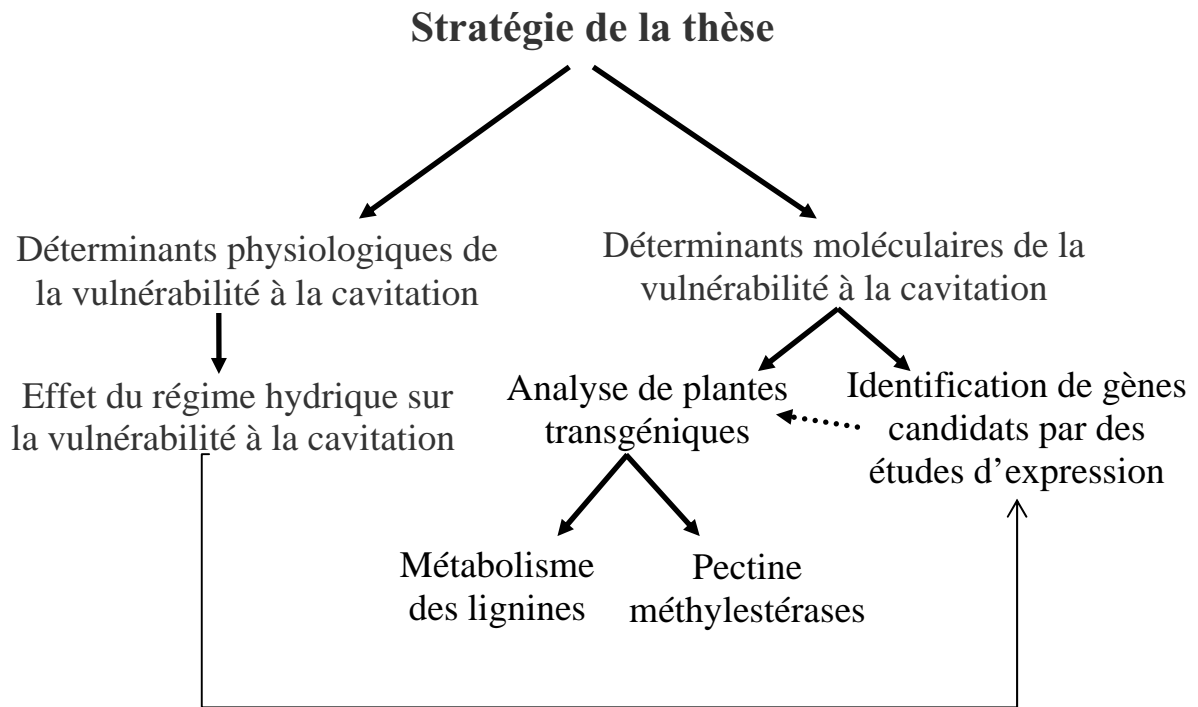


Fig. 21 : La stratégie générale de la thèse

nous conduit à choisir une approche de type « gènes candidats » avec deux approches différentes (figure 21) : 1) L'identification de gènes candidats par des études d'expression et 2) La validation de gènes candidats dans des plantes transgéniques.

Pour l'identification de gènes candidats par des études d'expression, nous avons utilisé le modèle expérimental de la plasticité phénotypique développé dans le premier volet. Il s'agissait de comparer l'expression de gènes impliqués dans la paroi en relation avec des changements de la vulnérabilité à la cavitation.

Pour la validation de gènes candidats dans des plantes transgéniques, nous nous sommes intéressés au métabolisme des pectines et à celui des lignines. Nous avons utilisé différentes lignées de peupliers transgéniques modifiées dans les compositions des lignines pour examiner leur rôle dans les propriétés hydriques du xylème, ainsi que dans ses propriétés mécaniques. Ce choix est motivé par la présence de lignines dans les ponctuations qui pourraient être importantes, voire majoritaires. En effet, les lignines constituent le principal composant de la lamelle moyenne et de la paroi primaire du xylème desquels la paroi de la ponctuation dériverait. Nous avons aussi utilisé des peupliers transgéniques surexprimant une pectine méthylestérase (PME), pour tester son rôle et celui des pectines dans les propriétés hydriques des arbres, en particulier la vulnérabilité à la cavitation. Le choix de ces plants se justifie par le rôle déterminant du calcium dans la vulnérabilité à la cavitation. La disponibilité des lignées déjà construites et caractérisées a été un autre critère de choix pour les lignées utilisées, aussi bien pour les lignines et les pectines.

Les résultats du travail de thèse sont présentés sous la forme de trois chapitres organisés sous forme d'articles et présentant successivement les résultats obtenus sur :

- 1) l'acclimatation de la vulnérabilité à la cavitation, ainsi que les analyses moléculaires et structurelles menées sur ce dispositif expérimental,
- 2) Le rôle du métabolisme des lignines dans la vulnérabilité à la cavitation, et les relations avec les propriétés hydrauliques,
- 3) Le rôle d'une pectine méthylestérase dans la vulnérabilité à la cavitation.

A l'issue des trois chapitres, les principaux résultats acquis dans le cadre de ce travail sont discutés au regard des objectifs initiaux, et les perspectives de recherche les plus intéressantes sont évoquées.

Chapitre 1 :

Acclimatation de la vulnérabilité à la cavitation au régime hydrique et modifications des propriétés structurelles et d'expression géniques du xylème

L'étude de l'acclimatation au régime hydrique de la vulnérabilité du xylème à la cavitation a fait l'objet d'une publication parue dans le journal *Physiologia Plantarum* (2010), Vol 139, pp 280-288. Les effets de cette acclimatation sur les propriétés structurelles des ponctuations et sur l'expression de gènes dans le xylème sont ensuite présentées dans une section « résultats supplémentaires ».

Résumé de la publication parue dans *Physiologia Plantarum* (2010), 139 : 280-288.

La vulnérabilité à la cavitation du xylème diffère entre les espèces selon leur résistance à la sécheresse, les espèces les plus xérophi les étant les plus résistantes à la cavitation du xylème. La variabilité de la vulnérabilité à la cavitation du xylème se retrouve également au sein des espèces, en particulier entre les populations *in situ*. Cependant, l'origine de cette variabilité n'a pas été clairement identifiée. Ici, nous avons analysé la réponse des propriétés hydriques du xylème de *Populus tremula* × *Populus alba* à trois régimes hydriques différents. La vulnérabilité à la cavitation a été évaluée par les potentiels hydriques du xylème causant une perte de 12, 50 et 88% de la conductivité (P12, P50 et P88). Il est alors démontré que la vulnérabilité à la cavitation s'acclimate selon le niveau de teneur en eau du sol, avec des valeurs des P50 de -1.82, -2.03 et de -2.45 MPa pour des peupliers bien irrigués, modérément irrigués et peu irrigés, respectivement. La valeur de P12, la tension du xylème au dessus de laquelle la cavitation s'accroît fortement, a été corrélée avec la valeur la plus basse du potentiel hydrique foliaire de midi (ψ_m) enregistrée pour chaque plante. La différence entre les deux paramètres est d'environ 0,5 MPa, ce qui est en accord avec l'absence de différence du taux d'embolie entre les traitements hydriques. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que la vulnérabilité à la cavitation est un trait essentiel pour la résistance à la sécheresse. La diminution de la vulnérabilité à la cavitation sous conditions de croissance de la sécheresse du sol est corrélée avec une diminution du diamètre des vaisseaux, une augmentation de l'épaisseur de sa paroi et une plus forte résistance à l'implosion évaluée par le paramètre $(t/b)^2$. Les liens entre ces paramètres sont discutés.

Poplar vulnerability to xylem cavitation acclimates to drier soil conditions

Hosam Awad^{a,b}, Tete Barigah^{a,b}, Eric Badel^{a,b}, Herve Cochard^{a,b} and Stephane Herbette^{a,b,*}

^aClermont Université, Université Blaise Pascal, UMR 547 PIAF, F-63177, Aubière, France

^bINRA, UMR 547 PIAF, F-63100 Clermont-Ferrand, France

Correspondence

*Corresponding author,
e-mail: stephane.herbette@
univ-bpclermont.fr

Received 4 December 2009; revised 9
February 2010

doi:10.1111/j.1399-3054.2010.01367.x

Xylem vulnerability to cavitation differs between tree species according to their drought resistance, more xerophilous species being more resistant to xylem cavitation. Variability in xylem vulnerability to cavitation is also found within species, especially between in situ populations. The origin of this variability has not been clearly identified. Here we analyzed the response of xylem hydraulic traits of *Populus tremula* × *Populus alba* trees to three different soil water regimes. Stem xylem vulnerability was scored as the xylem water potential causing 12, 50 and 88% loss of conductivity (P_{12} , P_{50} and P_{88}). Vulnerability to cavitation was found to acclimate to growing conditions under different levels of soil water content, with P_{50} values of -1.82 , -2.03 and -2.45 MPa in well-watered, moderately water-stressed and severely water-stressed poplars, respectively. The value of P_{12} , the xylem tension at which cavitation begins, was correlated with the lowest value of midday leaf water potential (ψ_m) experienced by each plant, the difference between the two parameters being approximately 0.5 MPa, consistent with the absence of any difference in embolism level between the different water treatments. These results support the hypothesis that vulnerability to cavitation is a critical trait for resistance to drought. The decrease in vulnerability to cavitation under growing conditions of soil drought was correlated with decreased vessel diameter, increased vessel wall thickness and a stronger bordered pit field (t/b)². The links between these parameters are discussed.

Introduction

The summer drought and heat wave that occurred in Europe in 2003 seriously affected forest ecosystems (Levinson and Waple 2004, Meehl and Tebaldi 2004, Rebetez et al. 2006). Visible impact was reported in several regions of France, from partial crown dieback to individual deaths (Bréda et al. 2004, Rozenberg and Pâques 2004). As a consequence, there has been a rising demand for more drought-resistant plant materials, and this demand will surely increase with the greater

frequency and intensity of drought episodes expected in the future. Detailed knowledge of the mechanisms of drought response may give new insights into factors controlling plant productivity and survival in drought-prone regions (Brodribb and Hill 1999, Brodribb et al. 2002, Nardini and Salleo 2005). The mechanisms of trees' drought response are very diverse. Trees may adapt or acclimate to drier conditions. The first process occurs through gradual natural selection of genotypes with greater fitness in more xeric habitats. These ecotypes

Abbreviations – ψ_m , midday leaf water potential; ψ_p , predawn leaf water potential; C, control plants; MS, moderately water-stressed plants; P_{12} , P_{50} and P_{88} , xylem water potential causing 12, 50 and 88% loss of conductivity; SS, severely water-stressed plants.

could be identified in marginal populations and find use in future breeding or reforestation programs. In contrast, drought acclimation is a phenotypic response to a variation in water regime, whereby each individual tree modifies its phenotype during its lifespan. Before proposing drought-tolerant genotypes to foresters it is important to document the ability of current genotypes to acclimate to drier conditions.

During the last two decades, research on xylem embolism has considerably improved our understanding of tree responses to drought. In trees, water is transported under tension (negative pressure) in the xylem vessels. Under drought conditions, the tension in the xylem conduits increases and cavitation can occur. Cavitation causes an embolism, which restricts the water supply to leaves and other organs. It occurs only when the xylem pressure drops below a specific threshold value (ψ_{cav}) related to pit wall porosity (Tyree and Sperry 1988). Xylem vulnerability to cavitation is correlated with drought tolerance (Maherali et al. 2004, Pockman and Sperry 2000, Tyree et al. 2003), more xerophilous species being more resistant to xylem cavitation. This suggests that species able to keep xylem vessels functional under extreme droughts can more readily survive such events. Vulnerability to xylem cavitation has also been found to vary substantially within species (Lopez et al. 2005). For some species, these variations have been associated with a genotypic variability (Cochard et al. 2007, Ennajeh et al. 2008). For others, xylem vulnerability to cavitation has also been shown to acclimate to environmental conditions such as irradiance (Barigah et al. 2006, Cochard et al. 1999) or soil nutrient availability (Harvey and Van Den Driessche 1999). However, ability to acclimate to drier soil conditions remains largely unexplored and has been restricted to drought-tolerant species (Beikircher and Mayr 2009, Ladjal et al. 2005). Only a slight increase in xylem vulnerability to cavitation was observed in response to drought for a drought-sensitive willow cultivar (Wikberg and Ögren 2007). Responses to drought are species-specific and depend on the plant's hydraulic strategy (Bréda et al. 2006). For example, only one of three Mediterranean cedar species tested showed an acclimation of its vulnerability to cavitation to drier soil conditions (Ladjal et al. 2005).

In this study, we analyzed the capacity of xylem hydraulic traits in poplar to acclimate to different soil water regimes. Poplar is a pioneer species that is very sensitive to water stress and highly vulnerable to cavitation (Cochard et al. 2007). Pioneer species are known to acclimate better to changed environments (Bazzaz 1979, Fetcher et al. 1983, Grime 1979). Thus we hypothesized

that it would display a marked plasticity in its vulnerability to cavitation. Potted poplar clones were grown in a controlled environment under different level of water stress and the impact on their hydraulic traits and xylem properties was analyzed at the end of the growth period. We discuss the trade-off between safety and efficiency.

Materials and methods

Plant material and culture conditions

Experiments were carried out on a hybrid poplar (*P. tremula* × *P. alba*, clone INRA 717-1B4). Plants were multiplied clonally in vitro on Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog 1962). When they reached 4 cm in height, they were gradually acclimated on a hydroponic solution (Morizet and Mingeau 1976) and grown in a controlled environment room: 16-h daylight, at 21–22°C, 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (day) and 18–19°C (night) with relative humidity 70 ± 10%. At age 57 days and height 30 cm, they were transferred to 10-l pots filled with a commercial soil (40% black, 30% brown and 30% blond peat moss, pH 6.1, DUMONA-RN 75-3851 Arandon, Holland) and grown in a greenhouse: 16-h daylight, at 22(±1)°C, 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (day) and 19(±1)°C (night) with relative humidity 70 ± 10%. The same weight of soil was provided so that the weight of each pot was 5 kg. Watering was then adjusted until each pot weighed 7 kg.

Experimental design

The experiment started at the date of the potting. Twenty-four poplar plants were divided into three sets of eight plants subjected to three different water regimes. The first set of plants was used as a control (C) and was maintained with optimal water status, i.e. 70–100% of field capacity (FC) between successive waterings. The second set of plants was moderately water-stressed (MS) so that the soil water content ranged between 40 and 75% of FC. The third set of plants was severely water-stressed (SS) so that the soil water content ranged between 25 and 45% of FC. Leaf wilt was observed when the soil content reached 25% of FC. The soil water content was checked by weighing the pots. At the start of the experiment, each pot weighed 7 kg and each plant was at optimal water status. The plants were then watered every 3, 4 or 5 days depending on their assigned watering regime. Fig. 1 shows the time course of the FC of the soil. For each set of plants, the watering was performed when the minimal soil water content (25, 40 or 70 % of FC) was reached in one pot, and the water was brought using a

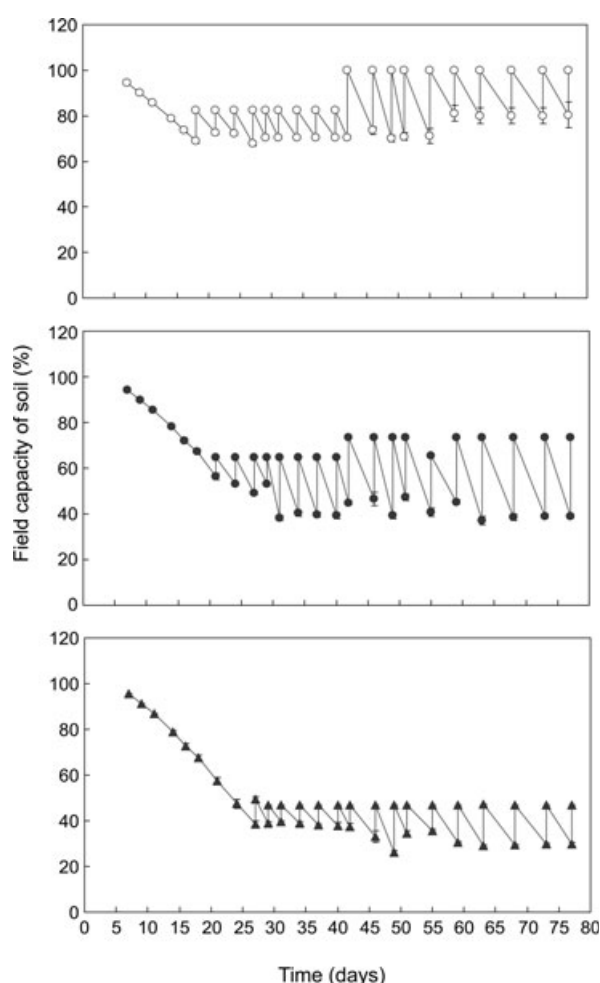


Fig. 1. Time course of the FC of the soil under three different water regimes. A survey of the FC of the soil was carried out for C plants (open circles), MS plants (closed circles) and SS plants (closed triangles). When the FC reached the minimal value (see section on Materials and methods), pots were watered to adjust FC to the maximal value. Each point represents the mean value (\pm SE) of the FC for eight plants.

watering can to reach the maximal soil water content (45, 75, 100% of FC).

Leaf water potentials

The midday and predawn leaf water potentials (ψ_m and ψ_p) were measured using a pressure chamber (Scholander et al. 1965). Two leaves per plant were removed to measure ψ_m and ψ_p . Predawn water potential was recorded between 04:00 and 06:00 solar time and ψ_m was recorded between 12:00 and 14:00 solar time. The measurements were made at 46, 47, 80 and 81 days after the beginning of the experiment, just before watering (Days 46 and 80) and 1 day after watering (Days 47 and 81).

Native embolism and specific conductivity

Native embolism (% of loss conductivity) and specific conductivity ($\text{mol MPa}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$) were measured on 0.2-m long samples using a XYL'EM® xylem embolism meter (Bronkhorst, Montigny-les-Cormeilles, France), following the procedure described previously (Cruziat et al. 2002, Sperry et al. 1988). The technique involves measuring the hydraulic conductance of segments before and after water refilling (K_i and K_{\max} , respectively). Stem segments were excised under water and their ends cut with a sharp razor blade. The basal cut end was then attached to the hydraulic apparatus. The solution used was composed of 10 mM KCl and 1 mM CaCl_2 . The solution flowed from a flask through the branch segment, which was kept under water during the measurement. We measured K_i and K_{\max} under low pressure (6 kPa). Before measuring K_{\max} , air obstructing stem xylem vessels was removed by applying a series of 5-min hydraulic pressure flushes (0.15 MPa).

Vulnerability curves

Vulnerability to xylem cavitation was assessed using the Cavitron technique (Cochard 2002a, Cochard et al. 2005). Its principle is as follows: a centrifugal force increases the water tension in a xylem segment and the loss of hydraulic conductance is measured at the same time. The curve of percentage loss of xylem conductance (PLC) vs xylem water tension represents the vulnerability to cavitation of the sample. Vulnerability curves were plotted on one 0.28-m long sample per plant, i.e. eight samples for each watering rate. Xylem pressure (P) was first set to a reference pressure (-0.5 MPa) and the maximal conductance (K_{\max}) of the sample was determined. The xylem pressure was then set to a more negative value for 3 min and the conductance (K) of the sample was again determined. The percent loss of conductance of the sample was then given by:

$$\text{PLC} = 100 \times (1 - K/K_{\max}) \quad (1)$$

The procedure was repeated for more negative pressures (with -0.25 or -0.5 MPa increments) until PLC reached at least 90%. Rotor velocity was monitored with an electronic tachymeter (10 rpm resolution). The PLC curves were fitted using the following sigmoid function (Pammenter and van der Willigen 1998):

$$\text{PLC} = 100 / (1 + e^{(s(P-P_{50})/25)}) \quad (2)$$

where xylem water potential causing 50% loss of conductivity (P_{50}) is the pressure causing 50% loss of hydraulic conductivity and s is the slope of the curve

at this point (MPa^{-1}). Eqn (2) was used to estimate xylem water potential causing 12 and 88% loss of conductivity (P_{12} and P_{88}) values. $P_{12} = P_{50} + 50/s$, we call it the 'air entry point' (Sparks and Black 1999). It is interpreted as the xylem tension level at which runaway cavitation and embolism begin when the resistance to the air entry of pit membranes within the conducting xylem is overcome (Tyree and Sperry 1988). $P_{88} = P_{50} - 50/s$, the 'full embolism point', is interpreted as the limiting tension before the xylem becomes totally non-conductive (Domec and Gartner 2001). In our study, P_{12} and P_{88} were defined as the capacities for maintaining xylem conductivity. The more negative the P_{12} and P_{88} values are, the higher is the capacity to maintain xylem hydraulic conductivity.

Wood infradensity

Wood density is defined as:

$$d = \frac{M_0}{V_s} \quad (3)$$

A 2-cm long segment was cut from one end of each sample. Its fresh volume (V_s) was measured using an analytical balance by the Archimedes principle of water displacement. The dry mass (M_0) was determined after one night in a gravity convection oven at 104°C .

Anatomical traits

Anatomical traits were determined on the samples used to measure vulnerability to cavitation. For each sample, six cross sections were prepared from the basal part of the sample and stained with Astra blue and Safranin dyes. They were examined under an optical microscope (Zeiss Axioplan 2, Zeiss, Jena, Germany) and three images per cross section were randomly recorded using a digital camera (AxioCam HR, Zeiss) and AXIOVISION DIGITAL IMAGING software. After spatial calibration, anatomical measurements were made by image analysis using IMAGEJ software (Rasband 1997–2009). Two spatial magnifications were used. On $\times 20$ images (1 pixel = $0.52 \mu\text{m}$), the vessels were isolated by automatic segmentation (Ridler 1978). Their diameters (μm), their density (number mm^{-2}) and the total area they occupy on the image (μm^2) were measured. Then, on $\times 40$ images (1 pixel = $0.26 \mu\text{m}$), we measured the intervessel wall thickness (t) (μm) and the conduit wall span (b) (μm) to calculate the bordered pit field strengthening parameter $(t/b)^2$, according to Hacke et al. (2001). For these thickness measurements, the error is estimated to $0.26 \mu\text{m}$. It was repeated 10 to 15 times for each wall in order to evaluate the repeatability.

Results

Three sets of poplar plants were subjected to three contrasting water regimes (Fig. 1) and a survey of leaf water potentials was conducted. Before watering, the SS plants showed lower ψ_p and ψ_m values than the other plants (Fig. 2). After watering, there was no significant difference between the three treatments for ψ_p , and SS plants had the highest ψ_m values. No difference was observed between control (C) and MS plants, except for the ψ_p value, which was lower for MS plants before watering on Day 80.

At the end of the experiment, several physiological and anatomical parameters were analyzed (Table 1). The growth in height of the SS plants was reduced compared with C plants. The three sets showed differences in vulnerability to cavitation (Table 1 and Fig. 3). The SS plants appeared to be the least vulnerable to cavitation, with the lowest P_{50} values, whereas the C plants appeared to be the most vulnerable, with the highest P_{50} values. A significant difference was also found for P_{12} and P_{88} values between the SS plants and the plants from the other treatments. However, the slopes of the vulnerability curves were similar (Fig. 3 and Table 1). No significant difference was found in specific conductivity between the three sets of plants, or for embolism level, which remained low. At the anatomical level, vessel diameters and hydraulic diameters were smaller in the

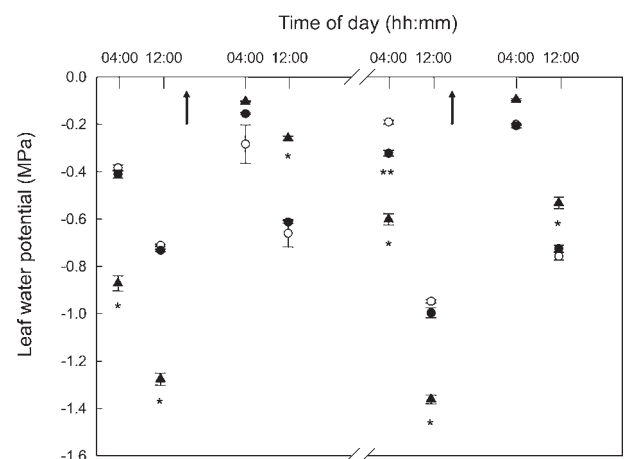


Fig. 2. Time course of leaf water potentials (ψ) of poplars depending on water regime. The ψ values were measured on C plants (open circles), MS plants (closed circles) and SS plants (closed triangles) at two periods separated by a break on the axis: 46–47 days (left) and 80–81 days (right) after the beginning of the treatment. The ψ_p were recorded at 04:00 solar time and the ψ_m were recorded at 12:00 solar time. The waterings are indicated with an arrow. The measurements were made just before watering and the day after watering. Each data represents the mean value ($\pm \text{SE}$) for eight plants. Data that are significantly different between treatments have different symbols (*, **).

Table 1. Physiological and anatomical parameters in poplar stems grown under three different water regimes. P_{50} , xylem pressure causing 50% loss of hydraulic conductivity; P_{12} , xylem pressure causing 12% loss of hydraulic conductivity; P_{88} , xylem pressure causing 88% loss of hydraulic conductivity; A_v , total surface area occupied by vessels; $(t/b)^2$, vessel wall thickness (t) conduit wall span (b). Data represent the mean values (\pm se) for eight plants. Values on each line not followed by the same letter differ significantly at $P \leq 0.05$ (one-way ANOVA).

Parameter	Well-watered plants	Moderately water-stressed plants	Severely water-stressed plants
Plant height (cm)	148 ± 2^a	141 ± 2^a	117 ± 2^b
P_{50} (MPa)	-1.82 ± 0.05^a	-2.03 ± 0.06^b	-2.45 ± 0.09^c
P_{12} (MPa)	-1.44 ± 0.10^a	-1.57 ± 0.12^a	-1.95 ± 0.14^b
P_{88} (MPa)	-2.20 ± 0.05^a	-2.50 ± 0.05^b	-2.95 ± 0.09^c
Slope line (% MPa^{-1})	158 ± 32^a	125 ± 17^a	120 ± 23^a
Specific conductivity ($\text{mmol m}^{-1} \text{MPa}^{-1} \text{s}^{-1}$)	1.63 ± 0.22^a	2.05 ± 0.15^a	1.53 ± 0.08^a
Embolism level (%)	20.2 ± 6.3^a	12.0 ± 7.5^a	7.0 ± 2.5^a
Wood density (g l^{-1})	371 ± 9^{ab}	354 ± 4^a	382 ± 8^b
Vessel diameter (μm)	48.3 ± 0.7^a	46.7 ± 0.7^a	41.6 ± 0.8^b
A_v (μm^2)	18.3 ± 0.6^a	18.7 ± 0.4^a	19.4 ± 0.5^a
Vessel density (number mm^{-2})	94 ± 3^a	103 ± 4^a	135 ± 3^b
Vessel wall thickness (μm)	3.89 ± 0.03^a	4.10 ± 0.04^a	4.53 ± 0.11^b
$(t/b)^2$	0.0046 ± 0.0005^a	0.0032 ± 0.0002^a	0.0085 ± 0.0007^b

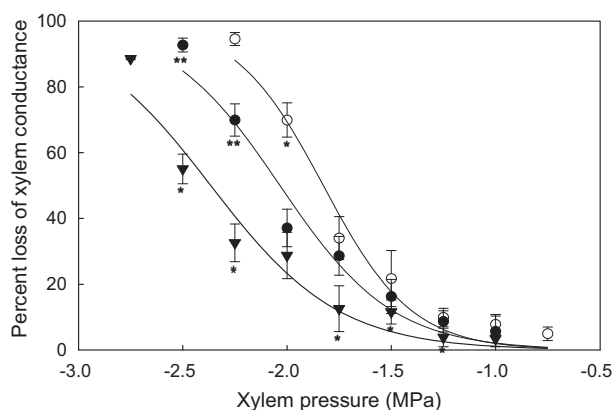


Fig. 3. Xylem vulnerability curves of stems depending on water regime. The percentage loss of xylem hydraulic conductance with decreasing xylem water potential is represented for C plants (open circles), MS plants (closed circles) and SS plants (closed triangles). Each data represents the mean (\pm se) of eight samples. Full lines represent the fitted data according to Eqn (2) (see section on Materials and methods). Data that are significantly different between treatments have different symbols (*, **).

SS plants than in the MS and C plants. Also, SS plants had the largest vessel densities and the thickest vessel walls. There was no significant difference in the stem area occupied by vessels (A_v) between the plant sets.

The correlation between vulnerability to cavitation and anatomical traits was tested. Fig. 4 shows that the P_{50} was not correlated with wood density. Also, the linear regression between P_{50} and wood density values for each plant was not significant ($r = 0.351$ and $P = 0.1189$). On the other hand, P_{50} was positively correlated with vessel diameter and negatively correlated with vessel wall

thickness (Fig. 4). The plants that were most resistant to cavitation also had the highest values of $(t/b)^2$.

Discussion

Poplars are well known for their susceptibility to drought and are among the most vulnerable trees tested to date (Hacke and Sauter 1996). Cochard et al. (2007) investigated the differences in drought resistance among some poplar clones, with small differences up to 0.12 MPa. Here, we show that the resistance to drought can vary between poplar plants from the same genotype exposed to different water soil availabilities, with differences up to 0.63 MPa. These results suggest that phenotypic plasticity accounts for a large part of the within-species variability for vulnerability to cavitation. The observed acclimation of vulnerability to cavitation to soil water content supports the hypothesis that cavitation resistance is a trait for drought resistance across trees.

Difference in water regimes

ψ_p and ψ_m have been considered as good indices for evaluating plant water status (Shackel et al. 1997). The three sets of trees truly underwent three different water regimes because they showed significantly different ψ_p values before watering. Control plants kept their ψ_p values constant before and after watering. This indicates that the water availability did not vary for these plants in the course of the experiment. MS plants did not experience water stress, as revealed by the absence of significant difference for ψ_m and for growth between MS and C plants (Table 1). However, MS plants probably adjusted their water loss from the leaves without any

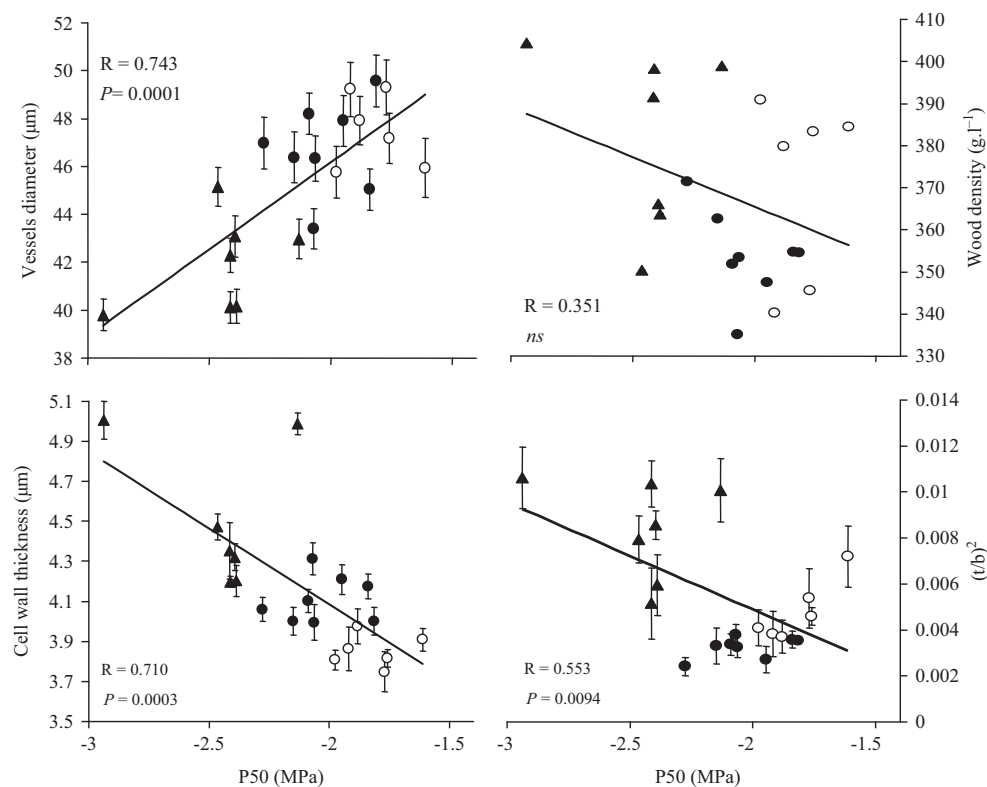


Fig. 4. Correlation between xylem pressure causing 50% loss of conductivity (P_{50}) with vessel diameter (top left), vessel wall thickness (bottom left), wood density (top right) and $(t/b)^2$ (bottom right). Each point represents the data for one individual tree from C plants (open circles), MS plants (closed circles) or SS plants (closed triangles). For vessel diameter, vessel wall thickness and $(t/b)^2$, each data point is a mean (\pm se) of 92 to 167 measures on three stem sections. The line is a linear regression, statistically significant with the P value indicated. The linear regression is not significant (ns) with $P = 0.1189$ for wood density plotted vs P_{50} .

change in their stem conductivity or xylem structure (vessel diameter, A_v , vessel density; Table 1). The slower decrease in soil water content of MS plants (0.304 l day^{-1} at the end of the treatment) between successive waterings suggests lower water consumption compared with C plants (0.385 l day^{-1} , see also Fig. 1). On the contrary, SS plants experienced water stress; both their ψ_m and ψ_p were lower before watering and their growth was reduced. Thus, this experimental set-up allows us to document the effect of water soil availability on vulnerability to cavitation, with or without water stress.

Variation in vulnerability to cavitation

Here, we found that the vulnerability to xylem cavitation acclimated to a decrease in soil water availability. No difference for native steady xylem embolism was found between the three water regimes. We can therefore rule out the possibility that the drought-induced decrease in

vulnerability to cavitation was artificially because of an increase in the embolism level. If water-stressed plants have higher level of embolism, then the vulnerability curves would be plotted on the remaining functional vessels, which are the most resistant. In this study, it was then essential to observe similar levels of embolism across treatments to decipher true acclimation from more mechanical shifts in xylem vulnerability curves. The magnitudes of these changes in vulnerability to cavitation were linked to the severity of the water stress, and they were observed even when the poplar trees did not experience water stress, the MS plants being less vulnerable to cavitation than the C plants. It is well known that stomatal control occurs to prevent xylem cavitation during drought (Sack and Holbrook 2006). The interval between ψ_{leaf} when the stomata close and ψ_{leaf} when the xylem is embolized is known as 'the safety margin' (Brodrick and Holbrook 2004, Sperry 2004, Sperry et al. 2002). The interval between the value

of P_{12} (Table 1) and the lowest ψ_m value experienced by each plant set (Fig. 2) remained stable (around 0.5 MPa) for the three sets of plants. Although stomatal closure allows xylem cavitation to be prevented or delayed, it is detrimental for gas exchanges and so may be the main control for short-term drought or mild water shortage. By contrast, adjustment of vulnerability to cavitation is a long-term process, implying the formation of new vessels, and can protect the plant from the next wave of cavitation events during long-term drought. In agreement with our results, some studies report a relationship between the xylem vulnerability to cavitation of stems and the ψ_m value experienced by plants (Brodribb and Cochard 2009, Cochard 2002b, Cochard et al. 2002, Hacke et al. 2000).

Xylem vulnerability to cavitation is thought to be a critical trait for drought resistance as it is correlated with drought resistance of different species (Maherali et al. 2004, Pockman and Sperry 2000, Tyree et al. 2003). Vulnerability to cavitation has also been found to differ between genotypes from the same species (Cochard et al. 2007, Dalla-Salda et al. 2009, Pita et al. 2003, Sangsing et al. 2004). However, the relationship between this variability and drought tolerance is still unclear. The decrease in vulnerability to cavitation when water deprivation occurs strongly supports the hypothesis that it is a trait for drought tolerance. To further test this hypothesis, the trees that grew under the three water regimes should be tested for their ability to withstand a new severe drought, which could be applied by stopping watering until the xylem water potential reaches the P_{88} value of the C plants.

Hydraulic compensation and trade-offs

Both hydraulic conductivity and drought-induced vulnerability to cavitation depend on pit membrane connecting xylem vessels. Thus resistance to cavitation has been assumed to be accompanied by lower pore hydraulic conductivity, and ultimately stem hydraulic conductivity (Sperry and Hacke 2004, Zimmermann 1983). This classic idea of trade-off between efficiency and safety functions is largely based on interspecific comparisons. Our data do not support it. Water shortage causes variation of vulnerability to cavitation but no change in the hydraulic conductivity. This lack of trade-off has already been observed at the within-species level for sequoia and Scots pine trees (Burgess et al. 2006, Martinez-Vilalta et al. 2009). However, this is less surprising in conifers because of the role of torus-margo pits in preventing cavitation (Cochard 2006). Although no difference was observed for stem hydraulic conductivity, vessel diameter, which accounts for the

hydraulic conductivity of vessels, is positively correlated with vulnerability to cavitation (Fig. 4). Hence, we can suppose that the pit membrane conductivity is higher in the trees that appear less vulnerable to cavitation to compensate for a reduced diameter. This conflicts with the efficiency-safety trade-off based on the pit membrane.

The negative water pressure in the xylem causes two threats: cavitation events through air seeding and xylem collapse. Among the anatomical traits we measured, vessel diameter, vessel wall thickness and strengthening of the bordered pit field $(t/b)^2$ were correlated with vulnerability to cavitation. The correlation we found between $(t/b)^2$ and P_{50} is weaker than those found at the between species level by Hacke et al. (2001). This can easily be explained by the small P_{50} and $(t/b)^2$ ranges we found at the within-species level compared with this other study. In addition, $(t/b)^2$ data were not different between the C and MS plants, weakening the correlation between P_{50} and $(t/b)^2$. This suggests that $(t/b)^2$ may be less sensitive to water regimes than vulnerability to cavitation. It was suggested that the $(t/b)^2$ was a safety factor for conduit collapse by negative pressure (Hacke et al. 2001). Although there is no causal link between vulnerability to cavitation and $(t/b)^2$, as they are located in different wall regions, the two traits are linked because they depend on the xylem pressure.

Wood density was proposed as an accessible parameter to estimate vulnerability to cavitation, based on investigations between species (Hacke et al. 2001). In this within-species investigation, no such correlation was evident (Fig. 4). Also, the water regimes did not lead to any difference in wood density (Table 1). Similarly, Cochard et al. (2007) did not find any correlation when comparing poplar clones or willows. In addition, there is no deterministic link between wood density and vulnerability to cavitation that is based on the pit membrane. Thus, it seems unrealistic to use wood density as a measure of vulnerability to cavitation at the within-species level.

In conclusion, vulnerability to cavitation becomes significantly lower as water soil content decreases, especially with a scaling of the air entry point (P_{12}) according to the ψ_m value. This supports the hypothesis that vulnerability to cavitation is a critical trait for resistance to drought. This study also shows the utility for poplar wood production in the light of predicted climate changes. It should be possible to adjust water supply to improve cavitation resistance. Easily measurable parameters such as vessel diameter, vessel wall thickness or $(t/b)^2$ are relevant anatomical traits that could be used to assess vulnerability to cavitation of a poplar genotype under different growth conditions.

References

- Barigah TS, Ibrahim T, Bogard A, Faivre-Vuillin B, Lagneau LA, Montpied P, Dreyer E (2006) Irradiance-induced plasticity in the hydraulic properties of saplings of different temperate broad-leaved forest tree species. *Tree Physiol* 26: 1505–1516
- Bazzaz FA (1979) The physiological ecology of plant succession. *Annu Rev Ecol Sys* 10: 351–371
- Beikircher B, Mayr S (2009) Intraspecific differences in drought tolerance and acclimation in hydraulics of *Ligustrum vulgare* and *Viburnum lantana*. *Tree Physiol* 29: 765–775
- Bréda N, Granier A, Aussenac G (2004) La sécheresse de 2003 dans le contexte climatique des 54 dernières années: analyse écophysiological et influences sur les arbres forestiers. *Rev For Fr* 56: 109–131
- Bréda N, Huc R, Granier A, Dreyer E (2006) Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. *Ann For Sci* 63: 625–644
- Brodribb TJ, Cochard H (2009) Hydraulic failure defines the recovery and point of death in water-stressed conifers. *Plant Physiol* 149: 575–584
- Brodribb TJ, Hill RS (1999) The importance of xylem constraints in the distribution of conifer species. *New Phytol* 143: 365–372
- Brodribb TJ, Holbrook NM (2004) Stomatal protection against hydraulic failure: a comparison of coexisting ferns and angiosperms. *New Phytol* 162: 663–670
- Brodribb TJ, Holbrook NM, Gutiérrez MV (2002) Hydraulic and photosynthetic co-ordination in seasonally dry tropical forest trees. *Plant Cell Environ* 25: 1435–1444
- Burgess SSO, Pittermann J, Dawson TE (2006) Hydraulic efficiency and safety of branch xylem increases with height in *Sequoia sempervirens* (D. Don) crowns. *Plant Cell Environ* 29: 229–239
- Cochard H (2002a) A technique for measuring xylem hydraulic conductance under high negative pressures. *Plant Cell Environ* 25: 815–819
- Cochard H (2002b) Xylem embolism and drought-induced stomatal closure in maize. *Planta* 215: 466–471
- Cochard H (2006) Cavitation in trees. *C R Phys* 7: 1018–1026
- Cochard H, Lemoine D, Dreyer E (1999) The effects of acclimation to sunlight on the xylem vulnerability to embolism in *Fagus sylvatica* L. *Plant Cell Environ* 22: 101–108
- Cochard H, Coll L, Leroux X, Ameglio T (2002) Unravelling the effect of plant hydraulics on stomatal closure during water stress in walnut. *Plant Physiol* 128: 282–290
- Cochard H, Gaele D, Bodet C, Tharwat I, Poirier M, Améglio T (2005) Evaluation of a new centrifuge technique for rapid generation of xylem vulnerability curves. *Physiol Plant* 124: 410–418
- Cochard H, Casella E, Mencuccini M (2007) Xylem vulnerability to cavitation varies among poplar and willow clones and correlates with yield. *Tree Physiol* 27: 1761–1767
- Cruiziat P, Cochard H, Ameglio T (2002) Hydraulic architecture of trees: main concepts and results. *Ann For Sci* 59: 723–752
- Dalla-Salda G, Martinez-Meier A, Cochard H, Rozenberg P (2009) Variation in wood density and hydraulics properties of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) clones related to a heat and drought wave in France. *For Ecol Manage* 257: 182–189
- Domec JC, Gartner BL (2001) Cavitation and water storage capacity in bole xylem segments of mature and young Douglas-fir trees. *Trees Struct Funct* 15: 204–214
- Ennajeh M, Tounekti T, Ahmedou MV, Khemira H, Cochard H (2008) Water relations and drought-induced embolism in two olive (*Olea europaea* L.) varieties ‘Meski’ and ‘Chemlali’ under severe drought conditions. *Tree Physiol* 28: 971–976
- Fetcher N, Strain BR, Oberbauer SF (1983) Effects of light regime on the growth, leaf morphology, and water relations of seedlings of two species of tropical trees. *Oecologia* 58: 314–319
- Grime JP (1979) *Plant Strategies and Vegetation Processes*. John Wiley, New York
- Hacke UG, Sauter JJ (1996) Drought-induced xylem dysfunction in petioles, branches and roots of *Populus balsamifera* L. and *Alnus glutinosa* L. Gaertn. *Plant Physiol* 111: 413–417
- Hacke UG, Sperry JS, Ewers BE, Ellsworth DS, Schafer KVR, Oren B (2000) Influence of soil porosity on water use in *Pinus taeda*. *Oecologia* 124: 495–505
- Hacke UG, Sperry JS, Pockman WT, Davis SD, McCulloh KA (2001) Trends in wood density and structure are linked to prevention of xylem implosion by negative pressure. *Oecologia* 126: 457–461
- Harvey HP, Van Den Driessche R (1999) Nitrogen and potassium effects on xylem cavitation and water use efficiency on poplar. *Tree Physiol* 19: 943–950
- Ladjal M, Huc R, Ducrey M (2005) Drought effects on hydraulic conductivity and xylem vulnerability to embolism in diverse species and provenances of Mediterranean cedars. *Tree Physiol* 25: 1109–1117
- Levinson DH, Waple AM (2004) State of the Climate in 2003. *Bull Am Meteorol Soc* 85: 72
- Lopez OR, Kursar TA, Cochard H, Tyree MT (2005) Interspecific variation in xylem vulnerability to cavitation among tropical tree and shrub species. *Tree Physiol* 25: 1553–1562
- Maherali H, Pockman WT, Jackson RB (2004) Adaptive variation in the vulnerability of woody plants to xylem cavitation. *Ecology* 85: 2184–2199
- Martinez-Vilalta J, Cochard H, Mencuccini M, Sterck F, Herrero A, Korhonen JFJ, Llorens P, Nikinmaa E,

- Nol  A, Poyatos R, Ripullone F, Sass-Klaassen U, Zweifel R (2009) Hydraulic adjustment of Scots pine across Europe. *New Phytol* 184: 353–364
- Meehl G, Tebaldi C (2004) More intensive, more frequent, and longer lasting heat waves in the 21st Century. *Science* 305: 994
- Morizet J, Mingeau M (1976) Effect of environment on water-uptake, as studied on beheaded exuding tomato. 1. Role of nutrients. *Ann Agron* 27: 183–205
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473–492
- Nardini A, Salleo S (2005) Water stress-induced modifications of leaf hydraulic architecture in sunflower: co-ordination with gas exchange. *J Exp Bot* 56: 3093–3101
- Pammenter NW, van der Willigen CV (1998) A mathematical and statistical analysis of the curves illustrating vulnerability of xylem to cavitation. *Tree Physiol* 18: 589–593
- Pita P, Gasco A, Pardos JA (2003) Xylem cavitation, leaf growth and leaf water potential in *Eucalyptus globulus* clones under well-watered and drought conditions. *Funct Plant Biol* 30: 891–899
- Pockman WT, Sperry JS (2000) Vulnerability to xylem cavitation and the distribution of Sonoran desert vegetation. *Am J Bot* 87: 1287–1299
- Rasband WS (1997–2009) ImageJ. U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. Available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- Rebetez M, Mayer H, Dupont O, Schindler D, Gartner K, Kropp JP, Menzel A (2006) Heat and drought 2003 in Europe: a climate synthesis. *Ann Forest Sci* 63: 569–577
- Ridler TW, Calvard S (1978) Picture thresholding using an iterative selection method. *IEEE Trans Syst Man Cybern* 8: 630–632
- Rozenberg P, P  ques L (2004) Evidence of the effect of the climate of year 2003 on Douglas-fir and larch wood formation in France. In: *Proceedings of Conference “Impacts of the Drought and Heat in 2003 on Forests”*. Scientific Conference 17–19 November 2004, Freiburg, Germany, 57, 38.
- Sack L, Holbrook NM (2006) Leaf hydraulics. *Ann Rev Plant Biol* 57: 361–381
- Sangsing K, Kasemsap P, Thanisawanyangkura S, Sangkhasila K, Gohet E, Thaler P, Cochard H (2004) Xylem embolism and stomatal regulation in two rubber clones (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Trees* 18: 109–114
- Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA (1965) Sap pressure in vascular plants. *Science* 148: 339–346
- Shackel K, Ahmadi H, Biasi W, Buchner W, Goldhamer D, Gurusinghe S, Hasey J, Kester D, Krueger B, Lampinen B, McGourty G, Micke W, Mitcham E, Olson B, Pelletreau K, Philips H, Ramos D, Shwankl L, Sibett S, Snyder R, Southwick S, Stevenson M, Thorpe M, Weinbaum S, Yeager J (1997) Plant water status as an index of irrigation need in deciduous fruit trees. *Hortic Technol* 7: 23–29
- Sparks JP, Black A (1999) Regulation of water loss in populations of *Populus trichocarpa*: the role of stomatal control in preventing xylem cavitation. *Tree Physiol* 19: 453–459
- Sperry JS (2004) Coordinating stomatal and xylem functioning – an evolutionary perspective. *New Phytol* 162: 568–570
- Sperry JS, Hacke UG (2004) Analysis of circular bordered pit function – I. Angiosperm vessels with homogenous pit membranes. *Am J Bot* 91: 369–385
- Sperry JS, Donnelly JR, Tyree MT (1988) A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant Cell Environ* 11: 35–40
- Sperry JS, Hacke UG, Oren R, Comstock JP (2002) Water deficits and hydraulics limits to leaf water supply. *Plant Cell Environ* 25: 251–263
- Tyree MT, Sperry JS (1988) Do woody plant operate near the point of catastrophic xylem dysfunction caused by dynamic water stress? *Plant Physiol* 88: 574–580
- Tyree MT, Engelbrecht BMJ, Vargas G, Kursar TA (2003) Desiccation tolerance of five tropical seedlings in Panama. Relationship to a field assessment of drought performance. *Plant Physiol* 132: 1439–1447
- Wikberg J,   gren E (2007) Variation in drought resistance, drought acclimation and water conservation in four willow cultivars used for biomass production. *Tree Physiol* 27: 1339–1346
- Zimmermann MH (1983) *Xylem Structure and Ascent of Sap*. Springer-Verlag, New-York, p 143

Résultats supplémentaires

Introduction

Nous avons observé que la vulnérabilité à la cavitation du peuplier s'acclimatait en fonction du régime hydrique. Nous nous sommes intéressés aux bases génétiques de cette acclimatation. Comme nous l'avons vu dans le chapitre « synthèse bibliographique », la vulnérabilité à la cavitation serait dépendante de la structure des ponctuations. Nous avons alors focalisé nos recherches sur des gènes du métabolisme de la paroi et nous nous sommes aussi intéressés à la structure des ponctuations entre vaisseaux.

Pour rechercher les gènes potentiellement impliqués dans cette acclimatation, nous avons réalisé une analyse de l'expression par PCR quantitative en temps réel (PCRq) sur dix gènes impliqués dans le métabolisme de la paroi. La paroi de la ponctuation dérivant de la lamelle moyenne et de la paroi primaire, neuf de ces gènes participent au métabolisme de la paroi primaire : 2 pectines méthylesterases (PME1 et PME2), 2 polygalacturonases (PG1 et PG2), 3 UDPGlucose deshydrogenase (UGDH1, UGDH2 et UGDH3) et 2 Xylan 1,4- β -xylosidase (XYL1 et XYL2). Ils ont été sélectionnés d'après une analyse transcriptomique montrant qu'ils s'exprimaient au cours de la formation du xylème (Hertzberg et al., 2001). Nous avons aussi choisi un dixième gène impliqué dans le métabolisme de la paroi secondaire, codant pour une acide caffeique 3-*O*- méthyltransferase. Nous l'avons choisi car des plantes transgéniques modifiées pour ce gène étaient caractérisées dans le chapitre II de cette thèse. Plusieurs études ont mis en évidence une corrélation entre la structure des ponctuations et la vulnérabilité à la cavitation en comparant différentes espèces (Choat et al., 2003). Par contre, au commencement de nos travaux, il n'existait aucune étude abordant la variabilité structurale des ponctuations en lien avec la vulnérabilité à la cavitation au niveau intraspécifique.

Nous avons donc entrepris une analyse de la structure des ponctuations des xylèmes développés sous les traitements hydriques, à l'aide d'un microscope électronique à transmission.

Matériels et méthodes

I Analyse d'expression des gènes candidats par qPCR

I.1 Extraction des ARN totaux

Lors du prélèvement des tiges de peupliers soumis aux 3 régimes hydriques, un échantillon de 20 cm de long, situé au dessus de l'échantillon utilisé pour la vulnérabilité à la cavitation, était réservé pour les études d'expression géniques. Pour chaque régime hydrique, nous avons prélevé les échantillons sur 4 plantes lorsque le potentiel hydrique de midi était le

plus faible (avant l'arrosage), et sur 4 plantes lorsqu'il était le moins faible (après l'arrosage). Il y avait donc 6 conditions différentes de prélèvement (3 régimes hydriques avec 2 états hydriques) avec 4 plantes par condition. Sur cet échantillon de 20 cm, le xylème et l'écorce ont été séparés et immédiatement plongés dans l'azote liquide et conservés à -80°C . Les ARNs du xylème et de l'écorce ont été isolés à partir des tiges en utilisant la méthode décrite par Chang et al. (1993). Le matériel végétal congelé (environ 0.5-2 g) est broyé dans 1ml d'un tampon d'extraction (2% CTBA (hexadecyltrimethylammonium bromide, 2% PVP (polyvinylpyrrolidone), 100 mM Tris HCL (pH 8), 25 mM EDTA (pH 8), 2 M NaCl et H_2O) contenant 1.5ml β -mercaptoéthanol. Il est ensuite vortexé vigoureusement puis incubé 5 min à 65°C . La première centrifugation permet d'éliminer les débris cellulaire (protéines et lipides). Puis deux traitements successifs avec 1 volume de phénol (14.000 RPM, 20 min, 4°C), suivis de deux centrifugations (14.000 RPM, 20 min, 4°C) permettent d'éliminer les composés organiques (protéines, lipides et phénols). Les traces de phénol sont éliminées grâce à l'utilisation du Chloroforme et Alcool isomylique (24:1). Puis, les ARN sont précipités en présence de LiCl 8M (0.3 volume finale) pendant une nuit à 4°C . Le lendemain, les ARN précipités sont récupérés par une centrifugation (14.000 RPM, 45 min, 4°C). Le culot d'ARN est lavé par 500 μL d'éthanol 70% froid avec deux centrifugations (14.000 RPM, 5 min, 4°C). Les ARN sont solubilisés doucement dans 30 μL d'une solution contenant le tampon DNase 1X, 40 U de RNase et 1U de DNase (Promega – M6101) et l'ensemble est incubé pendant 15 min à température ambiante. La DNase est éliminée par un traitement avec 400 μL de SSTE et 500 μL de Chloroforme et Alcool isomylique (24:1), suivi d'une centrifugation (14.000 RPM, 10 min, 4°C). Les ARN sont ensuite précipités à l'aide d'éthanol absolu en plaçant les tubes 2h à -20°C ou 20 min à -80°C suivi d'une centrifugation (14.000 RPM, 45 min, 4°C). Le culot est lavé à deux reprises avec 500 μL d'éthanol froid. Le culot final contenant les ARNs est solubilisé dans 20 à 50 μL d'eau et stocké à -80°C . Pour contrôler la qualité et la quantité de l'ARN, nous réalisons une analyse du spectre d'absorption à 230, 260 et 280, 320 nm au spectrophotomètre Nanodrop (NanoDrop products, 3411 Silverside Rd Bancroft Building Wilmington, DE 19810, USA).

1.2 Synthèse des ADNc

La production d'ADN complémentaire (ADNc) à partir ARNm est nécessaire avant de réaliser une PCR classique ou quantitative. Le premier brin d'ADN est synthétisé par transcription inverse en utilisant 2 μg des ARNs totaux dans un volume final de 20 μL . avec le

Tableau 1: Liste des gènes, des numéros d'accèsion et des amorces utilisées en PCR.

Fonction	Nom	Sequences des amorces		Numéros d'accèsion (Genbank)
Acide caffeique 3- <i>O</i> -methyltransferase	COMT	Sens	5'TGATGCGCCTGTCATG3'	CF234721
		Antisens	5'CAAGGCCTATGGGATG3'	
Pectin methylesterase	PME1	Sens	5'GAGATGGTTAGGGAGG3'	AI164340
		Antisens	5'AATTACAGTTCGCCGAG3'	
	PME2	Sens	5'GAGTGGATGTCAGTAGC3'	AI165089
		Antisens	5'GCTAGCATGTCCACTC3'	
Polygalacturonase	PG 1	Sens	5'GGCAATCTCGAAATTGAG3'	AI163516
		Antisens	5'TGAGGTTTTGACCATGG3'	
	PG 2	Sens	5'CAGTCTTACCAGCCAC3'	AI164358
		Antisens	5'AAAGCTCCCTGGCCG3'	
UDP-glucose dehydrogenase	UGDH1	Sens	5'ACTGAAGTGCCCAGAC3'	AI163328
		Antisens	5'CCCAATAAGCTAGGTCG3'	
	UGDH2	Sens	5'GCTTTCAAGAAAGACACG3'	AI162135
		Antisens	5'TAACTTGCTCTATAGCTAC3'	
	UGDH3	Sens	5'ACTCAAGTGCCCGGAT3'	AI166238
		Antisens	5'CAGCACTCTCCCAGTAT3'	
Xylan 1,4- β -xylosidase	XYL 1	Sens	5'GAGAGGCCAGGAACTCCAGGG3'	AI164515
		Antisens	5'GACACCAGAGAGGAGGTCTGGG3'	
	XYL 2	Sens	5'GGGAGGACTTGTGAATGAGC3'	AI163643
		Antisens	5'GAACGATACGTCCATGCCC3'	
ARNr 18S	18s	Sens	5'TGACGGAGAATTAGGGTTCCG3'	AY652861
	18s	Antisens	5'CCTCCAATGGATCCTCGTTA3'	

kit « Super scriptTM III first strand synthesis system » (Invitrogen, Paisley, UK), selon les instructions du fournisseur. Il existe 4 étapes principales pour obtenir l'ADNc :

1) Dénaturation des ARNs en présence d'oligo dT à 65°C pendant 5min puis à 4°C pendant 2 min.

2) Transcription inverse par l'enzyme « Super script III » à 50°C pendant 1 heure puis arrêt de la réaction à 85°C pendant 5 min.

3) Elimination des structures double brin ARN-ADNc par la Rnase H 37°C pendant 20min.

4) Analyse de la qualité des ADNc obtenus par migration sur gel d'agarose (1%).

1.3 Clonage des ADNc d'intérêt

La liste des gènes d'intérêts amplifiés par PCR et les amorces utilisées pour leur amplification sont présentées dans le tableau 1. Afin de s'assurer de la séquence amplifiée par les amorces utilisées, les produits d'amplification de la PCR sont clonés puis séquencés. La réaction de PCR est réalisée à l'aide d'un thermocycleur dans une solution contenant : 0.2 µl de matrice ADNc, 0.4 µM de chaque amorce, 0.2 mM de dNTPs, le tampon Taq 1X, 1.5 mM de MgCl₂ et 0.5 à 1 U de Taq DNA polymérase et dans les conditions suivantes :

1 cycle	5 min à 94°C.
35 cycles	$\left\{ \begin{array}{l} 30 \text{ sec à } 94^{\circ}\text{C.} \\ 30 \text{ sec à } 55^{\circ}\text{C.} \\ 30 \text{ sec à } 72^{\circ}\text{C (ou 1 min pour les amplifications supérieures à 1000pb.)} \end{array} \right.$

Le clonage des fragments amplifiés comprend en trois étapes :

1) Extraction des fragments d'ADN du gel d'agarose en utilisant le kit « illustra GFX PCR DNA and gel band Purification kit » (Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshir, HP7 9NA, UK).

2) Ligation du fragment purifié et du vecteur PGem-Teasy (Promega, Charbonnières, France) avec l'aide de la T4 DNA ligase et selon les instructions données par le fournisseur.

3) Transformation des bactéries *E. coli* JM109 thermo-compétentes avec le produit de la ligation. La transformation est induite par un choc thermique de 45 secondes à 42°C puis 2 min dans la glace. Après une incubation de 1 h dans un milieu LB, les bactéries sont étalées sur un milieu LB agar et en présence d'ampicilline (100 µg. ml⁻¹) pour sélectionner les bactéries contenant le vecteur PGemT-easy. Le milieu LB est préalablement traité avec du X-

Gal et de l'IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside) afin de pouvoir sélectionner les vecteurs contenant un insert. Le vecteur possède au niveau du site d'insertion la partie du gène lac Z non muté. Lorsqu'aucun fragment d'ADN n'est inséré dans le vecteur, la protéine β -galactosidase est active dans la bactérie : c'est l' α -complémentation. Si un fragment d'ADN est inséré, on obtient une protéine de fusion β -gal non fonctionnelle. Pour vérifier la présence ou l'absence de l'activité enzymatique β -gal, on utilise un galactoside appelé X-Gal (équivalent coloré du lactose) qui donne un produit coloré quand il est clivé par l'enzyme. L'expression du gène β -gal est induit par l'IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside). L'insert est séquencé par une entreprise privée de séquençage.

I.4 Analyse de l'expression par PCR quantitative en temps réel (qPCR)

La qPCR est réalisée avec le thermocycler iCycler iQTM (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) sur les gènes et avec les amorces listés dans le tableau 1.

Lors de la réaction, la sonde fluorescente SYBR green se fixe sur l'ADN double brin et permet ainsi d'évaluer la quantité d'ADN amplifié. Un nombre de cycle, Ct, permettant d'atteindre un seuil de fluorescence est établi par le programme du thermocycleur « iCycler iQTM ». Cette valeur est utilisée pour quantifier l'ADN de façon absolue ou relative. Dans le calcul de la quantité d'ADN, il est important de connaître l'efficacité E de la PCR. Une PCR en temps réel sur des échantillons de dilution croissante permet d'obtenir une courbe étalon pour un couple d'amorce. E est alors calculée d'après cette courbe : $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$.

La quantité d'ADN est normalisée par rapport au niveau de l'ARN ribosomique 18 S (ARNr) qui s'exprime de façon constitutive.

La réaction de qPCR a été réalisée dans le mélange suivant : 2 μ l d'ADNc dilué (1: 40), 0.25 μ l de SYBR green dilué (Sigma, St-louis, USA) (1: 1000 en sulfoxyde de diméthyle 25%), 1 unité de platinum Taq ADN polymérase (Invitrogen, Paisley, UK) et 200 nM des amorces spécifiques de chaque gène dans un volume final de 25 μ l.

La réaction de qPCR est effectuée dans les conditions suivantes :

	-94°C 5 min
40 cycles	$\left\{ \begin{array}{l} -94^\circ\text{C } 15\text{s (dénaturation)} \\ -55^\circ\text{C } 20\text{s (hybridation)} \\ -72^\circ\text{C } 30\text{s (élongation)} \end{array} \right.$
81 cycles	- 0.5°C/10s, soit de 55°C à 95°C

Cette dernière étape permet de déterminer la température de fusion spécifique du fragment amplifié et elle permet donc de vérifier la spécificité d'amplification de la PCRq.

Pour chaque échantillon, 3 analyses qPCR sont réalisées. Le niveau relatif d'expression d'un gène est déterminé par le calcul du ratio suivant (Pfaffl, 2001) :

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{cible}} + 1)^{\Delta C_t \text{ cible (témoin - traité)}}}{(E_{\text{ref}} + 1)^{\Delta C_t \text{ cible (témoin - traité)}}} \quad \text{avec } E = 10^{(-1/\text{pente})} - 1$$

E_{cible} et E_{ref} : efficacités d'amplification du gène cible et du gène de référence (ARNr 18s), C_t : cycle seuil pour lequel le niveau de fluorescence fixé est atteint, témoin: ADNc de xylème de peupliers de la condition témoin, c'est-à-dire bien arrosé (voir chapitre 1).

II Microscopie électronique à transmission (MET)

II.1 Préparation des échantillons

La préparation des échantillons pour le microscope électronique consiste dans un premier temps à fixer le matériel végétal pour permettre une bonne conservation de la morphologie cellulaire puis, dans un deuxième temps, à imprégner les tissus par une résine capable de durcir et de donner un bloc à partir duquel on peut réaliser des coupes fines d'environ 50 à 100 nm d'épaisseur grâce à un ultra microtome.

Des sections transversales de tige de 3 à 5 mm de long ont été prélevées et immédiatement plongées dans le fixateur de Karnovsky modifié (glutaraldéhyde 3%, formaldéhyde 4% dans du tampon phosphate 0.1M à pH 7.4) pendant une nuit à température ambiante. Le matériel végétal est ensuite rincé six fois pendant 5 min dans du tampon phosphate 0.1M à pH 7.4 avant de réaliser une post-fixation au tetroxyde d'osmium 1% pendant 4h à température ambiante. Les échantillons sont ensuite rincés deux fois pendant 5 min avec le même tampon phosphate. Le matériel végétal est alors progressivement déshydraté par des bains d'éthanol de concentration croissante : 30%, 50%, 70 %, 80 %, 90% (30 min) puis 100% (30 min et une nuit).

Le lendemain, les échantillons déshydratés sont progressivement infiltrés par des solutions d'éthanol de concentrations croissantes de résine LR-White: résine 1/3 (v/v) pendant 30 min à 1h ; résine 1/2 (v/v) pendant 30 min à 1h, résine 2/3 (v/v) pendant 30 min à 1h ; puis

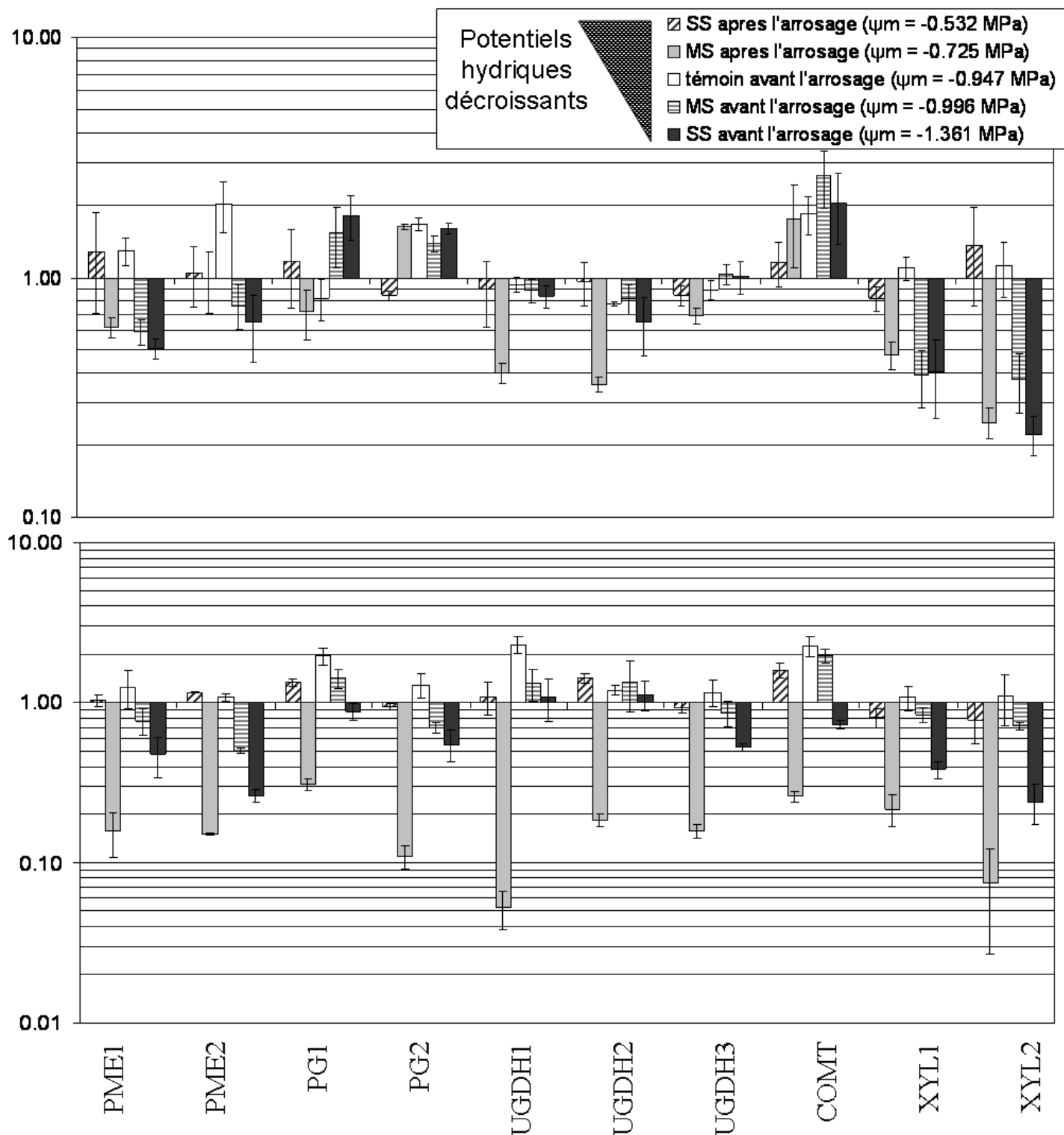


Fig. 1: Analyse de l'expression de gènes du métabolisme pariétal par PCRq. L'abondance relative des transcrits dans le xylème (A) et dans l'écorce (B) a été analysée dans 5 conditions de traitements hydriques différentes décrites dans la première partie du chapitre: lot bien arrosé (témoin) avant l'arrosage, lot modérément arrosé (MS) après et avant l'arrosage, lot peu arrosé (SS) avant et après l'arrosage. Les abondances relatives des transcrits dans ces 5 conditions sont exprimées par rapport à la condition "témoin" après l'arrosage. Le nom des gènes étudiés, leurs numéros d'accension et les séquences des amorces sont indiquées dans le tableau 1. Le niveau d'expression est calculé à partir de la formule donnée dans le matériel et méthodes. Chacune des données représente une valeur moyenne (E.S.) de 3 répétitions.

résine pure pendant 1h à 4°C. La résine pure est renouvelée et laissée pendant une nuit à 4°C pour une bonne imprégnation.

Les échantillons sont placés dans des gélules de gélatine avec de la résine pure puis le tout est placé à 55°C pendant environ 2 jours pour une bonne polymérisation.

Les échantillons inclus sont coupés à l'ultra-microtome (Leica UC6) pour obtenir des coupes semi-fines (1 µm) et ultra-fines (70 nm). Les coupes ultra-fines sont recueillies sur des grilles de cuivre, puis contrastées à l'acétate d'uranyl et au citrate de plomb et enfin carbonées.

II.2 La mesure des diamètres et des épaisseurs de la paroi

Les analyses de la structure des ponctuations ont été réalisées sur les peupliers soumis au régime hydrique le plus favorable et ceux soumis au régime hydrique le plus contraignant. Pour chaque traitement, les 8 plantes ont été utilisées et les analyses ont été réalisées sur les mêmes échantillons que ceux ayant servi à mesurer la vulnérabilité à la cavitation. Pour chaque échantillon, trois coupes transversales ont été préparées à partir de la partie basale de l'échantillon. Ils ont été examinés au microscope électronique à transmission (Hitachi H7650). Onze à 23 images par section ont été enregistrées en utilisant un appareil photo numérique (Hamamatsu AMT40) et le logiciel AMT (HAMAMATSU PHOTONICS K.K., Hamamatsu city, 431-3196, Japan). Les mesures ont été faites par analyse d'image à l'aide du logiciel ImageJ (Rasband, 1997-2009). Les mesures des diamètres de l'ouverture et de la paroi de la ponctuation n'ont été faites que sur les ponctuations présentant deux ouvertures claires sur l'image (Fig.2). Chaque ponctuation présentant 2 ouvertures, nous avons calculé la moyenne des 2 diamètres. Les coupes, les observations et l'acquisition des images ont été effectuées au Centre d'Imagerie Cellulaire Santé des Facultés de Médecine et de Pharmacie de Clermont-Ferrand.

Résultats - discussion

Les expressions de 10 gènes du métabolisme pariétal ont été analysées sur le xylème et sur l'écorce de peupliers soumis à 3 régimes hydriques différents et dans 2 états hydriques (avant et après arrosage). Ces analyses sur les 2 parties de la tige devaient permettre de distinguer les modifications d'expression géniques spécifiques du xylème. Bien que les ponctuations soient retrouvées dans plusieurs types cellulaires, celles des vaisseaux du xylème ont une structure unique, et forte probablement une composition différente des autres ponctuations. Notre objectif était donc de détecter les gènes qui soient spécifiquement

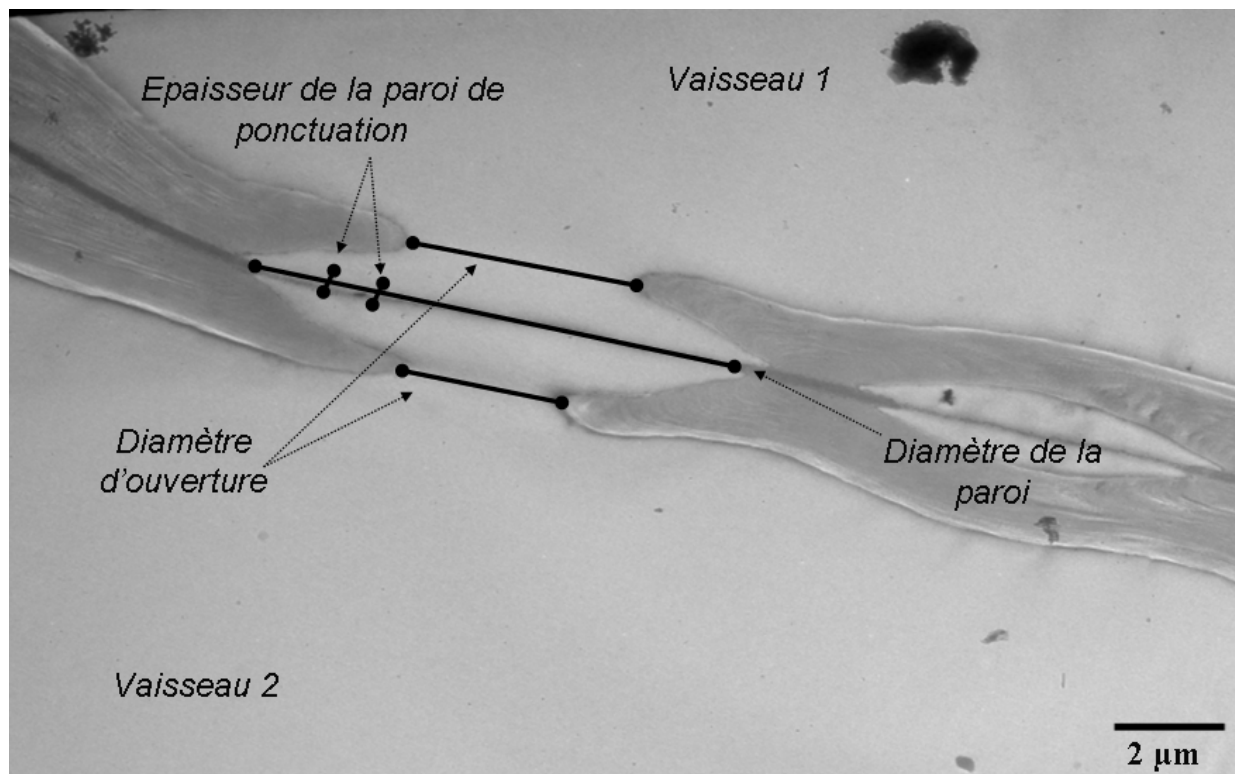


Fig. 2 : Ponctuation entre deux vaisseaux observée en microscopie électronique à transmission sur une coupe transversale de xylème de peuplier. Les doubles flèches indiquent les mesures qui ont été réalisées : diamètre de la paroi de la ponctuation, diamètre de chaque ouverture et épaisseur de la paroi de ponctuation.

impliqués dans les modifications de ces ponctuations en lien avec l'acclimatation de la vulnérabilité à la cavitation au régime hydrique. Ainsi, les expressions des 10 gènes ont été testés dans les tissus du xylème et l'écorce pour les 6 conditions différentes. Les ARN extraits de peupliers au régime hydrique le plus favorable et après l'arrosage constitue la condition témoin et les 5 autres conditions sont analysées par rapport au témoin (Fig 1A, B). Neuf gènes sont impliqués dans le métabolisme de la paroi primaire (PME1, PME2, PG1, PG2, UGDH1, UGDH2, UGDH3, XYL1 et XYL2) et il avait été montré qu'il s'exprimait au cours de la formation du bois (Hertzberg et al., 2001). Un gène est impliqué dans le métabolisme des lignines (OMT). Ce gène est induit ou non modifiée dans le xylème et l'écorce dans toutes les conditions sauf la condition modérément arrosé (MS) dans l'écorce.

Dans la condition (SS) après l'arrosage, aucune différence d'expression par rapport à la condition témoin n'a été observée pour les 10 gènes étudiés dans les tissus du xylème et l'écorce. Cette absence de différence d'expression peut s'expliquer par l'absence de différence significative pour les potentiels hydrique entre les 2 conditions de traitement (voir le chapitre I).

Les expressions des gènes impliqués dans la biosynthèse des monosaccharides (XYL1, XYL2, UGDH1, UGDH2 et UGDH3) sont toutes réprimées ou non modifiées dans les conditions où le potentiel hydrique minimal est le plus faible (SS avant l'arrosage, (MS) avant l'arrosage et (MS) après l'arrosage) aussi bien dans le xylème que dans l'écorce.

Les polygalacturonases et les pectines méthylesterases, enzymes de modification de la paroi, montrent des profils d'expressions différentes. L'expression des polygalacturonases (PG1 et PG2) est réprimée ou non modifiée dans toutes les conditions. Quant aux pectines méthylesterases (PME1 et PME2), elles sont sous-exprimées ou non modifiées dans toutes les conditions du xylème et l'écorce, à l'exception de PME2 qui est surexprimée dans une condition (témoin avant l'arrosage).

Les différences d'expression entre les traitements hydriques apparaissent donc comparables entre le xylème et l'écorce. Les modifications d'expression observées ne sont donc pas spécifiques du xylème et ne peuvent donc pas être liées au métabolisme des ponctuations entre vaisseaux. Les ponctuations entre vaisseaux se forment exclusivement lors de la formation des vaisseaux du xylème. Ces structures en formation représentent une part très faible de l'ensemble du xylème également constitué de fibres, de parenchyme, de cellules associées aux vaisseaux et de vaisseaux matures. Les populations d'ARN de ces vaisseaux en formation représenteraient donc une très faible proportion des populations d'ARN du xylème. Ainsi, les modifications d'expression géniques liées au régime hydrique semblent concerner

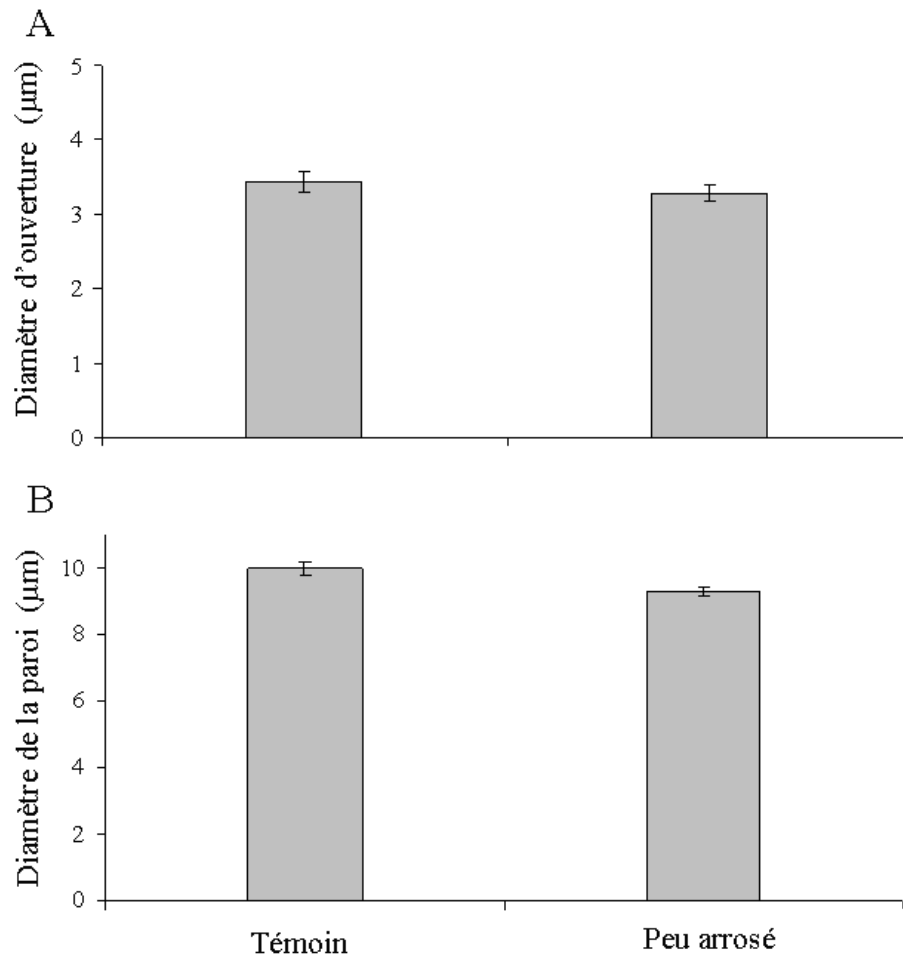


Fig. 3 : Diamètres d'ouverture de la ponctuation (A) et de la paroi de la ponctuation (B) selon le régime hydrique des peupliers. Les mesures ont été réalisées sur des échantillons de peupliers au régime hydrique le plus favorable "témoin" et de peupliers au régime hydrique le plus contraignant « SS ». Les données sont des valeurs moyennes (E.S.) de 78 à 98 ponctuations. Selon une analyse de variance (ANOVA), il y a une différence significative entre les 2 conditions pour le diamètre de la paroi de la ponctuation ($P < 0.05$), mais pas pour le diamètre d'ouverture.

l'ensemble des cellules vivantes du xylème et de l'écorce. Au vu de nos résultats, il n'apparaît donc pas judicieux de rechercher des gènes impliqués dans la vulnérabilité à la cavitation par des approches d'études d'expression génique sur l'ensemble du xylème.

Le processus de la cavitation survient lors de la pénétration de l'air à travers la paroi d'une ponctuation d'un vaisseau rempli d'air à un vaisseau rempli de sève, un processus connu sous le nom de "germe d'air" (Zimmermann, 1983; Sperry et Tyree, 1988). Afin de déterminer s'il existe des bases structurales à la variation de la vulnérabilité à la cavitation entre les traitements hydriques, nous avons entrepris une analyse des échantillons de bois par microscopie électronique à transmission (TEM, Fig.2). Ces mesures ont été réalisées sur les bois de peupliers soumis aux 2 traitements hydriques les plus contrastés. Trois mesures ont été faites à un grossissement de 5000X :

- 1) le diamètre de l'ouverture de la ponctuation (Fig. 3A),
- 2) le diamètre de la paroi de la ponctuation (Fig. 3B),
- 3) l'épaisseur de la paroi de ponctuation.

Il n'y a pas de différence entre les plants des 2 traitements hydriques pour le diamètre de l'ouverture. Cependant, les peupliers soumis au régime contraignant ont des ponctuations avec un diamètre statistiquement plus faible que celles des peupliers témoin. L'analyse structurale de la ponctuation entre les vaisseaux du xylème a été effectuée pour la première fois au niveau intra-spécifique. D'après nos données, plus le diamètre de la paroi de la ponctuation est court et plus le vaisseau est résistant à la cavitation. Cette corrélation peut trouver deux explications non exclusives l'un de l'autre :

- 1) Une réduction du diamètre de la paroi et donc de la surface réduirait la probabilité d'avoir un pore laissant passer l'air à une pression donnée.
- 2) Lorsqu'il y a une différence de pression entre le vaisseau rempli de sève et celui rempli d'air, la paroi se trouve étirée. Cet étirement est d'autant plus faible que le diamètre de la paroi est petit. Ainsi, les pores dans la paroi sont moins élargis et leur vulnérabilité au passage d'air est plus faible.

Malgré une seconde série d'analyse à plus fort grossissement (100000X), nous n'avons pas pu réaliser des mesures fiables de l'épaisseur de la paroi des ponctuations. Les variations locales de l'épaisseur de la paroi étaient trop importantes. Le peuplier présenterait donc une paroi trop fine qui ne permet pas d'envisager ce type de mesure. Il faut noter que la fixation et l'inclusion ont été réalisées sur des échantillons de xylème qui étaient déshydratés, et il est donc possible que la paroi de la ponctuation ait été modifiée et amincie par la déshydratation. Bien que la quantification n'ait pas été possible, les échantillons des différents traitements ne

semblaient pas présenter des variations visibles d'épaisseur. Récemment, Plavcova et al (2011) ont trouvé chez le peuplier des différences entre des branches d'ombre et des branches de lumière pour la résistance à la cavitation et l'épaisseur de la paroi de la ponctuation. Cette étude suggère que l'épaississement de la paroi de la ponctuation est responsable, au moins en partie, de l'acclimatation des branches de lumière pour une plus faible vulnérabilité à la cavitation.

Chapitre 2 :

Relation entre vulnérabilité à la cavitation et propriétés mécaniques chez des peupliers transgéniques modifiées pour le métabolisme des lignines

Cette étude a fait l'objet d'un article soumis pour publication dans la revue *Experimental and Environmental Botany*.

No trade-off between hydraulic and mechanical properties in several transgenic poplars modified for lignin metabolism

Hosam AWAD^{1,2}, Stéphane HERBETTE^{1,2}, Nicole BRUNEL^{1,2}, Aude TIXIER^{1,2}, Gilles PILATE³, Hervé COCHARD^{2,1}, Eric BADEL^{2,1}

¹ Université Blaise-Pascal, UMR 547 PIAF, F-63177 Aubière Cedex, France.

² INRA, UMR 547 PIAF, F-63100 Clermont-Ferrand Cedex 01, France

³ INRA, UR 0588 AGPF, F-45075 Orléans Cedex 2, France

Corresponding author:

Stéphane HERBETTE

Physique et Physiologie Integratives de l'Arbre Fruitier et Forestier (PIAF)

UMR INRA - Université Blaise-Pascal 547

24, avenue des Landais

F - 63177 AUBIERE cedex

Tel: +33(/0) 473 40 79 28

FAX: +33(/0) 473 40 79 16

stephane.herbette@univ-bpclermont.fr

Keywords: water stress, woody plants, forest trees, embolism, lignin, mechanical properties, hydraulic properties, trade-off, xylem cavitation, hydraulic efficiency, Young's modulus.

Résumé

Le bois assure les fonctions de transport d'eau et de support mécanique des arbres. La sève est transportée sous pression négative dans les conduits du xylème, qui sont alors soumis à un risque d'embolie lors d'une sécheresse extrême. Typiquement, les bois denses ont une plus grande résistance à l'implosion des vaisseaux et des propriétés mécaniques plus fortes. Dix lignées de peupliers (*Populus tremula* x *Populus alba*) transgéniques modifiés pour l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme de la lignine nous ont permis d'analyser le rôle de la lignine dans les propriétés hydrauliques et mécaniques, et de tester l'hypothèse d'un compromis entre ces deux propriétés. Des lignées de peuplier sous-expriment les gènes codant pour la cinnamoyl alcool déshydrogénase (CAD), la cinnamoyl-CoA réductase (CCR) et l'acide caféique 5 hydroxyférulique 3-O-méthyltransférase (COMT), alors que de nouvelles lignées de peupliers sous-expriment le gène CAD ou surexpriment le gène MYB308 codant pour un facteur de transcription réprimant le métabolisme des phénylpropanoïdes. Afin de maximiser les possibilités d'observer des différences de comportements entre lignées, les plants ont été cultivés sous deux régimes hydriques différents, et l'impact sur leurs propriétés hydrauliques et mécaniques du xylème a été analysé et le lien entre ces propriétés ont été testés. Nos résultats montrent que la résistance à la cavitation du xylème est plus faible pour les lignées transgéniques par rapport au témoin 717-1B4, alors qu'aucune tendance, positive ou négative, pour le module longitudinal d'Young est observée entre les lignées transgéniques et le témoin. Les lignées ASOMT10b et ASOMT2b, qui présentent une sous-expression pour tous les gènes pariétaux analysés, ont aussi une plus faible valeur de la résistance à l'implosion. Par contre, aucune différence n'a été observée pour la conductivité hydraulique du xylème, entre les lignées. Les changements dans la composition en lignine dans ces lignées transgéniques, n'a donc pas affecté le transport de l'eau, malgré un changement drastique de la teneur en lignine. Nos données sur ces lignées de peupliers transgéniques ne soutiennent donc pas l'hypothèse du compromis entre les propriétés mécaniques et hydrauliques. Par ailleurs, nous avons observé une acclimatation au régime hydrique pour les P50 mais pas pour le module de Young. Et, la lignée MYB308-25.1 montre à la fois de meilleures propriétés mécaniques et une plus forte vulnérabilité à la cavitation que la ligne témoin 717-1B4. Pour terminer, nous présentons des preuves que les lignines sont impliquées dans la vulnérabilité à la cavitation, probablement grâce à des modifications de la structure et du comportement des ponctuations.

Abstract

Wood provides water transport and mechanical support of trees. Sap is transported under negative pressure in plant xylem conduits, which can be subject to embolism during severe drought. Typically, denser woods show higher resistance to vessel implosion and stronger mechanical properties. Ten transgenic poplar lines modified for expression of genes involved in lignin metabolism were produced from the female clone 717-1B4 of *Populus tremula* × *P. alba* to examine the role of lignin in the hydraulic and mechanical properties, and to test the hypothesis of a trade-off between these two functions. Poplar lines underexpressed genes encoding for cinnamoyl alcohol dehydrogenase (CAD), cinnamoyl CoA reductase (CCR) and caffeic acid 3-*O*-methyltransferase (COMT), while new poplar lines underexpressed the CAD genes or overexpressed the MYB308 gene, encoding for a transcription factor repressing the phenylpropanoid metabolism. To maximize the contrast between line behaviors, these plants were grown under two different water regimes, and the impact on their hydraulic traits and xylem properties was analyzed to test for a link between water condition and mechanical and hydraulic properties. Our results show that the resistance to xylem cavitation was lower for the transgenic lines than for the control line 717-1b4 while they show neither a positive nor a negative tendency for the longitudinal Young's modulus between the transgenic lines and the control line. ASOMT10b and ASOMT2b, which possessed a down-regulated expression for all the genes, showed a lower value of the resistance to implosion index. No difference for xylem hydraulic conductivity between the lines was found. The changes in lignin composition in these transgenic lines did not affect the water transport, despite a drastic change in the lignin content. Our data on the transgenic poplar lines do not therefore support the mechanical *vs.* hydraulic trade-off hypothesis. Moreover, we observed an acclimation to water stress for P_{50} but not for the Young's modulus. MYB308-25.1 showed better mechanical properties and vulnerability to cavitation than the control line 717-1b4. Finally, we present evidence that lignins are involved in the vulnerability to cavitation, probably through modifications of pit structure and behaviour.

Introduction

Wood performs several functions in trees, the two most specific being water transport and mechanical support. Sap is transported under negative pressure (tension) in plant xylem conduits (Zimmermann, 1983). Under drought conditions, if the water potential in a xylem vessel drops below a threshold limit of pressure, cavitation events occur and the vessel is embolized and can no longer transport water (Tyree and Dixon, 1986). Xylem cavitation can affect plant productivity and plant survival (McDowell et al., 2008; Brodribb and Cochard, 2009), and xylem vulnerability to cavitation is correlated with drought tolerance (Maherali et al., 2004; Pockman and Sperry, 2000; Tyree et al., 2003). However, lower vulnerability to cavitation is correlated with lower hydraulic conductivity (Cochard et al., 1992; Hacke et al., 2006). This trade-off between safety and efficiency will depend on the pit area and the pit membrane structure. Pits, which are pores in the walls, are the main pathway for the water flow, and they prevent the passage of air bubbles from one embolized vessel to a conducting vessel. In addition to cavitation events, xylem vessels have to resist implosion under negative pressure. The structural parameters that control this collapse involve the transversal mechanical cell wall properties and the shape of the vessel: the higher the ratio of the vessel wall thickness (t) to the lumen diameter (b), the more mechanically resistant the cylinder is to transverse buckling (Hacke et al., 2001; Cochard et al., 2004; Brodribb and Holbrook, 2005 and Awad et al., 2010). The fibre matrix surrounding the vessels also appears to play a key role (Hacke et al., 2001; Jacobsen et al., 2005). In support of this, drought resistance is positively correlated with wood density, which is a function of wall thickness, lumen diameter and latewood fraction. Drought resistance may thus go with stronger wood (Hacke et al., 2001; Niklas, 1997).

Mechanical support can be enhanced at the tissue level by a decrease in wood porosity, i.e. principally an increase in wood density, and at the cell wall level, by microfibril angle changes, arrangement of the cell wall layers or cell wall chemistry (Gindl, 2001; Mencuccini et al., 1997; Jagels et al., 2003; Jagels and Visscher, 2006). Stems have also to be mechanically resistant to cope with external forces such as wind, and at this scale, their resistance depends mainly on microfibril angles and wood density (Meylan and Probine, 1969; Lindström et al., 1998; Lichtenegger et al., 1999). An increasing number of studies indicate that there may be interrelations between hydraulic and mechanical stress acclimation. These interactions are positive or, on the contrary, trade-offs. Some studies have found a trade-off between hydraulic conductivity and mechanical strength (Gartner, 1991a,b,c;

Wagner et al., 1998; Jagels et al., 2003; Christensen-Dalsgaard et al., 2007), while others have failed to find any trade-off (Woodrum et al., 2003; Pratt et al., 2007; Rosner et al., 2008, 2007; Utsumi et al., 2010). However, xylem safety (resistance to cavitation and implosion) and mechanical strength have still been found to be positively correlated (Rosner et al., 2008; Utsumi et al., 2010; Pratt et al., 2007), possibly because both functions depend on wood density. According to Pratt et al. (2007), the stem mechanical strength appears to be important in maintaining xylem transport under negative pressure and this could be a strategy both to prevent vessel collapse and to withstand mechanical stresses caused by gravity or wind. However, insights into the genetic control of both vulnerability to cavitation and resistance to implosion are still lacking, which hinders the assessment of possible trade-offs between the hydraulic and mechanical functions of wood.

Lignins are a characteristic feature of secondary cell walls and account for 20–30% of the dry mass of wood. They consist of complex phenolic polymers resulting from dehydrogenative polymerization (*via* radical coupling reactions) of three primary phenylpropanoid monomers, *p*-coumaryl (4-hydroxy-cinnamyl), coniferyl (4-hydroxy-3-methoxy-cinnamyl), and sinapyl (3,5-dimethoxy-4-hydroxy-cinnamyl) alcohols, analogs varying in their degrees of methoxylation (Harkin, 1967; Freudenberg and Neish, 1968). Lignin deposition is restricted to certain cell types, such as tracheid elements, fibres or vessels in the xylem and sclerenchyma. In these cells, lignin is mainly, in proportion, deposited in the middle lamella and the primary wall, and to a lesser extent in the secondary wall (Fromm et al., 2003). Ubiquitous in vascular plants, lignin plays important roles in structural support, providing additional rigidity and compressive strength (Niklas, 1992; Chabannes et al., 2001). Transgenic tobacco plants with a lower cinnamoyl alcohol dehydrogenase (CAD) activity produced lignin with a reduced crosslink density and xylem with a reduced tensile stiffness (Hepworth and Vincent, 1999). These plants compensated for a reduced Young's modulus by producing more xylem tissue that ensures stem rigidity, suggesting that lignin is involved in mechanical properties. The enzymes of lignin biosynthesis have been studied for many years and several genes of the biosynthesis pathway were cloned many years ago (Boudet et al., 1995; Whetten and Sederoff, 1995). Many attempts at biotechnological modification of lignification have been made to decrease the total quantity of lignin in plant tissues, or modify its monomer constitution, for the pulp and paper industries (Whetten and Sederoff, 1991; Dean and Eriksson, 1992).

In this study, we used transgenic poplars with modified lignin compositions to examine the role of lignin in wood hydraulic and mechanical properties, and to verify the

hypothesis of a trade-off between them. We used different poplar lines underexpressing genes encoding for cinnamoyl alcohol dehydrogenase (CAD) (Baucher et al 1996, Lapierre et al., 1999, Pilate et al., 2002), cinnamoyl CoA reductase (CCR) (Leplé et al., 1998) and caffeic acid 3-*O*-methyltransferase (COMT) (Lapierre et al., 1999, van Doorselaere et al 1995, Pilate et al., 2002). We also produced new poplar lines underexpressing the CAD genes, and other lines overexpressing the MYB308 gene, encoding for a transcription factor repressing the phenylpropanoid metabolism. To maximize the contrast between lines, these plants were grown under two different water regimes, and the impact on their hydraulic traits and xylem properties was analyzed. This enabled us to test the hypothesis that the effects of water conditions on the mechanical and the hydraulic properties were linked.

Materials and methods

2.1 Plant materials and culture conditions

Ten transgenic poplar lines modified for expression of genes involved in lignin metabolism were produced by the Research Unit for Forestry Improvement, Genetics and Physiology, National Institute of Agronomic Research, Orléans, BP 20619 Ardon 45166 Olivet, France. All the lines were obtained from the female clone 717-1B4 of *Populus tremula* × *P. alba* using the procedure described in Leplé et al. (1992) and using a disarmed *Agrobacterium tumefaciens* strain (C58pMP90 with a binary vector derived from pBIN+). In the SCAD1 line, the CAD (cinnamoyl alcohol dehydrogenase) activity is down-regulated (Lapierre et al., 1999). In the CCR-FS3 and CCR-FAS13 lines, the CCR (cinnamoyl CoA reductase) activity is down-regulated (Leplé et al., 2007). In the ASOMT10b and ASOMT2 lines, COMT (caffeic acid 3-*O*-methyltransferase) activity is down-regulated (Lapierre et al., 1999).

Two other poplar transgenic lines (p70-ASCAD25.1 and p70-ASCAD34.2) strongly down-regulated for CAD activity were obtained after cocultivation with a binary vector carrying the entire *cad* cDNA in antisense orientation under the control of the double 35S promoter from CaMV (Lapierre et al., 2004). Likewise, two independent transformants overexpressing the AmMYB308 gene under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter were produced using the overexpression construct from Tamagnone et al. (1998). This transcription factor is known to inhibit both phenolic acid metabolism and monolignol production, and transgenic plants expressing MYB308 exhibit decreased lignin content in their vascular tissue (Tamagnone et al., 1998).

Ther plants were multiplied clonally *in vitro* on Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog, 1962). When they reached 4 cm in height, they were gradually acclimatized on a hydroponic solution (Morizet and Mingeau, 1976) and grown in a controlled environment room: 16 h daylight, at 21–22 °C, 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (day) and 18–19 °C (night) with $70 \pm 10\%$ relative humidity. After they reached 57 days of age and 30 cm in height, they were transferred into 10-liter pots filled with a commercial soil (40% black, 30% brown and 30% blond peat moss, pH 6.1, DUMONA-RN 75-3851 Arandon, Holland) and grown for 90 days in a greenhouse: 16 h daylight, at $22 (\pm 1) ^\circ\text{C}$, 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (day) and $19 (\pm 1) ^\circ\text{C}$ (night) with $70 \pm 10\%$ relative humidity.

Two experiments with different water regimes were successively conducted on the poplar lines, with 3 to 4 plants per line and per experiment. In a first experiment (Exp. 1), plants were grown with a soil water content ranging between 40% and 75% of field capacity (FC). In a second experiment (Exp. 2), plants were grown under a water-stressed condition so that the soil water content ranged between 25% and 45% of FC. At the start of the experiment, the soil water content was 100% of FC, so that each plant was set up with an optimal water status. The soil water was evaluated by the measurement of the weight of the pots, and the plants were then watered every 3, 4 or 5 days depending on their assigned watering regime.

2.2 Leaf water potentials

The midday and predawn leaf water potentials (ψ_m and ψ_p) were measured using a pressure chamber (Scholander et al., 1965). Two leaves per plant were removed to gauge ψ_m and ψ_p . Predawn water potential was recorded between 04:00 and 06:00 am solar time and ψ_m was recorded between 12:00 and 14:00 pm solar time. The measurements were made for Exp. 2 after 85 days from the beginning of the experiment, just before watering and one day after watering.

2.3 Vulnerability curves

Vulnerability to xylem cavitation was assessed with the Cavitron technique (Cochard, 2002; Cochard et al., 2005). Its principle is as follows: a centrifugal force progressively increases the water tension in a xylem segment, and the resulting loss of hydraulic conductance is measured at the same time. The curve of percentage loss of xylem conductance (PLC) *versus* xylem water tension represents the sample's vulnerability to cavitation. Vulnerability curves were determined on one 0.28 m long sample per plant; i.e. four samples for each transgenic line. Xylem pressure (P) was first set to a reference pressure (-0.5 MPa) and the maximal conductance (K_{max}) of the sample was determined. The

xylem pressure was then set to a more negative value for 3 minutes and the conductance (K) of the sample was re-measured. The percent loss of conductance of the sample was then computed as:

$$PLC = 100 \times (1 - K / K_{\max}).$$

The procedure was repeated for more negative pressures (with -0.25 or -0.5 MPa step increments) until PLC reached at least 90%. Rotor velocity was monitored with an electronic tachymeter (10 rpm resolution). The PLC curves were fitted using the following sigmoid function (Pammenter and van der Willigen, 1998):

$$PLC = 100 / (1 + e^{s(P-P_{50})/25})$$

where P_{50} is the xylem pressure causing 50% loss of conductance and s is the slope of the curve at its inflection point.

2.4 Wood infradensity

Wood xylem density is defined as

$$\rho = \frac{M_0}{V_s}$$

A 20 mm long segment was cut from the basal end of each sample used for analyses of vulnerability to cavitation. Its fresh volume (V_s) was measured according to the Archimedes principle by water displacement with an analytical balance. Its dry mass (M_0) was determined after drying to constant weight for one night in an oven at 104°C .

2.5 Mechanical behavior

Mechanical tests were performed on the same fresh samples that had previously been characterized for their vulnerability to cavitation. The bark was peeled to focus on the xylem properties. The longitudinal Young's modulus E_L was measured by the three-points bending method on a mechanical testing machine (INSTRON 5565). The distance between the external support points was set at 140 mm. The experiment was controlled by the displacement of the central force application point. Its speed was set at 5 mm min^{-1} . A preload, controlled by a force limit (0.5 N), ensured the first contact with the sample. Four load-unload cycles were then performed in such a way that the strain never exceeded the elastic limit: the maximum displacement was set at 1.8 mm. Force and displacement were simultaneously recorded by Bluehill© software. The last three load cycles were used for the evaluation of the linear slope α of the displacement-force curves. The sample was assumed to

be a regular cylindrical beam, and its diameter was measured with a laser beam micrometer for three points. The mean values were used for the slope and the diameter to compute the longitudinal Young's modulus E_L from:

$$E_L = \frac{4 L^3}{3 \pi D^4} \alpha$$

where L is the distance between the external support points and D is the mean diameter of the sample.

The specific Young's modulus E_ρ is defined as the elastic modulus per unit of mass density.

2.6 Anatomical traits

Anatomical traits were characterized for all the samples used to measure the vulnerability to cavitation and mechanical properties. Sections were prepared from the basal part of the sample and stained with Astra blue and Safranin dyes. Sections were examined under an optical microscope (Zeiss Axioplan 2, Zeiss, Jena, Germany), and data were recorded using a digital camera (AxioCam HR, Zeiss) with AxioVision digital imaging software. Images were recorded for six sections per sample. After spatial calibration, anatomical measurements were performed by image analysis using ImageJ software (Rasband 2009). Automatic segmentation enabled us to isolate the vessels, and their diameters (μm), their numerical areal density (mm^{-2}) and the area fraction they occupied (%) were measured. We then measured the vessel wall thickness t (μm) between joining vessels and the conduit wall span b (μm) separating them to calculate the transversal reinforcement index of the bordered pit field $(t/b)^2$, according to Hacke et al. (2001).

2.7 RNA isolation and cDNA synthesis

A 10 cm long stem segment was collected above the one used for analysis of vulnerability to cavitation. The bark was peeled off and the xylem was immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C . The xylem from each plant was ground. Equal quantities of ground xylem from each plant were then pooled for RNA extraction. RNA was isolated using CTAB extraction buffer as described by Chang et al. (1993) and stored at -80°C . First strand cDNAs were synthesized by reverse transcription using 2 μg of total RNA in a final reaction volume of 20 μl using the Super Script™ III first strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen, Paisley, UK) according to the manufacturer's instructions. PCR amplifications were performed as described by Mai et al. (2009) using the primers

Table 1. Gene ID, accession numbers and primer sequences used in QPCR analyses.

Gene ID	Name	Primer sequences	Accession number (Genbank)
Caffeic acid 3- <i>O</i> -methyltransferase	COMT	Forward 5'TGATGCGCCTGTCATG3' Reverse 5'CAAGGCCTATGGGATG3'	CF234721
Pectin methylesterase	PME1	Forward 5'GAGATGGTTAGGGAGG3' Reverse 5'AATTACAGTTCGCCGAG3'	AI164340
	PME2	Forward 5'GAGTGGATGTCAGTAGC3' Reverse 5'GCTAGCATGTCACTC3'	AI165089
Polygalacturonase	PG 1	Forward 5'GGCAATCTCGAAATTGAG3' Reverse 5'TGAGGTTTTGACCATGG3'	AI163516
	PG 2	Forward 5'CAGTCTTACCAGCCAC3' Reverse 5'AAAGCTCCCTGGCCG3'	AI164358
UDP glucose dehydrogenase	UGDH1	Forward 5'ACTGAAGTGCCCAGAC3' Reverse 5'CCCAATAAGCTAGGTCTG3'	AI163328
	UGDH2	Forward 5'GCTTTCAAGAAAGACACG3' Reverse 5'TAACTTGCTCTATAGCTAC3'	AI162135
	UGDH3	Forward 5'ACTCAAGTGCCCGGAT3' Reverse 5'CAGCACTCTCCCAGTAT3'	AI166238
Xylan 1,4- β -xylosidase	XYL 1	Forward 5'GAGAGGCCAGGAACTCCAGGG3' Reverse 5'GACACCAGAGAGGAGGTCTGGG3'	AI164515
	XYL 2	Forward 5'GGGAGGACTTGTGAATGAGC3' Reverse 5'GAACGATACGTCCATGCCC3'	AI163643

indicated in Table 1. The PCR products were ligated into PGEM-Teasy vector (Promega, Charbonnières, France) and transformed into DH5α *E.coli* strain, and the sequences were checked.

2.8 Expression analysis by quantitative real-time PCR

The single strand cDNA was used as a template in quantitative real time PCR (QPCR) reactions as described in Mai et al. (2009). The cDNA was normalized in dependence of the level of constitutively expressed 18S rRNA (Nualpun et al., 2005). QPCR reactions were carried out with gene specific primers (Table 1) in the following 25 µl mixture: 2 µl diluted cDNA, 0.25 µl of diluted SYBR Green (Sigma, St. Louis, USA; 1:1,000 in 25% dimethyl sulfoxide), 1 U of platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Paisley, UK) and 200 nM of each gene-specific primer. QPCR reactions were carried out in a iCycler iQ™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The PCR program was as follows: incubation for 5 min at 95 °C, followed by 40 cycles of denaturing at 94 °C for 15 s, annealing at 55 °C for 20 s and extension at 72 °C for 30 s, followed by a melting curve analysis to check the specificity of fragment amplification. For each condition, three replicates were performed for QPCR analysis. The method to calculate the relative expression ratio is described by Pfaffl (2001):

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}} + 1)^{\Delta \text{CP}_{\text{target}} (\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}} + 1)^{\Delta \text{CP}_{\text{ref}} (\text{control} - \text{sample})}} .$$

2.9 Statistical analysis

We carried out an analysis of variation (ANOVA) to determine whether the means of P_{50} , Young's modulus, wood density, specific Young's modulus, leaf water potential and anatomical parameters were significantly different. When we found a significant difference, we referred to Tukey's multiple range test at $P < 0.05$ to compare the mean values between the control line 717-1b4 and the other lines. All the measured and derived data underwent statistical analysis using the Statgraphics plus 4.1 software package.

Results

The transgenic poplar lines were compared with the non-transformed line in two experiments with different water regimes. To check whether the water status in the transgenic poplar was modified, a survey of leaf water potentials was conducted in Exp. 2, for which the water regime was the more restrictive (Table 2). Before and after irrigation, i.e. when the soil

water content was respectively at its lowest and highest levels, the nine transgenic lines showed no significant difference between them and the control line 717-1b4 for the ψ_m and ψ_p values. At the end of the two experiments, stem samples were collected and several physiological, anatomical and molecular biological tests were performed. Table 1 shows the P50 and Young's modulus mean values for each transgenic line in both Exp.1 and Exp. 2. P50 values of transgenic lines were higher (lower resistance to cavitation) than the control line 717-1b4 in the two experiments (Table 3). The difference became significant between the control line 717-1b4 and the six transgenic lines ASOMT10b, ASOMT2b and MYB308-25.1, CCR-52.3fs, 70ASCAD25.1, 70ASCAD34.2 in Exp. 2 and only CCR-52.3fs in Exp. 1. For the longitudinal Young's modulus we found neither a positive nor a negative trend between the transgenic lines and the control line. Nevertheless, the lines 70ASCAD25.1, CCR-62.13fas and CCR-52.3fs showed statistically much lower stiffness than the control line in Exp. 1, whereas only the line MYB308-25.1 showed a higher Young's modulus in Exp. 2. The results from Figure 1 show no correlation between P50 and Young's modulus.

To explain variations in the Young's modulus, we investigated the two factors that could influence the mechanical property of the wood: the specific Young's modulus (Fig. 2A), which is a property of the wall, and the wood density (Fig.2B). The specific Young's modulus was lower in the CCR-62.13fas and 70ASCAD25.1 lines than in the control line in Exp. 1, whereas it was higher in 70ASCAD34.2 and MYB308-12.3 in Exp. 2 (Fig.2A). No difference was found between the transgenic and the control lines for wood density, except in Exp. 1 for the SCAD1 line (Fig 2.A, B).

The difference found for P_{50} between ASOMT10b and ASOMT2b and the control line 717-1b4 for P_{50} in Exp. 2 prompted us to study their anatomical features and the regulation of their wall metabolism at the gene expression level. The vessel diameters, the area fractions they occupied and the vessel density showed no significant difference between the three lines (Table 4). However, ASOMT10b and ASOMT2b showed a lower value of the resistance to implosion index evaluated by $(t/b)^2$ in both Exp. 1 and Exp. 2 (Table 4).

To explain this difference in $(t/b)^2$, the expression of ten genes involved in the wall metabolism (Table 1) was studied in xylem tissue for the ASOMT10b and ASOMT2b lines and compared with the control line 717-1b4 (Fig. 3). Since the difference in $(t/b)^2$ was found in both Exp. 1 and Exp. 2, we investigated the gene expression only for one experiment, Exp. 1. The ASOMT10b and ASOMT2b lines showed a down-regulated expression for all the genes compared with the control line, and these differences were significant in an ANOVA test (Fig. 3).

Table 2. Predawn and midday leaf water potentials (ψ_p and ψ_m) of transgenic poplars in Exp. 2. The ψ_p and ψ_m values were measured on the 10 transgenic poplar lines at the end of the experiment. The measurements were made just before irrigation, when the water soil content was minimal and the day after irrigation, when the water soil content was maximal. Each data point represents the mean value (S.E.) from 4 to 5 leaves. There was no significant difference between lines, according to an ANOVA analysis ($P = 0.05$).

Line	717-1b4	CCR- 62.13fas	CCR- 52.3fs	70ASCAD 25.1	70ASCAD 34.2	ASOMT 10b	ASOMT 2b	MYB308- 25.1	MYB308- 12.3	SCAD1										
Before irrigation																				
ψ_p (MPa)	0.86	0.25	0.88	0.36	0.97	0.17	0.86	0.48	0.86	0.35	0.91	0.12	0.86	0.14	0.51	0.06	0.93	0.34	0.80	0.18
ψ_m (MPa)	1.18	0.24	1.22	0.14	1.27	0.10	1.37	0.07	1.22	0.08	1.16	0.13	1.24	0.11	1.15	0.11	1.27	0.16	1.20	0.15
After irrigation																				
ψ_p (MPa)	0.02	0.01	0.03	0.01	0.03	0.02	0.04	0.01	0.04	0.00	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03	0.01	0.01	0.00	0.05	0.02
ψ_m (MPa)	0.36	0.08	0.34	0.09	0.38	0.11	0.30	0.02	0.40	0.07	0.38	0.13	0.27	0.04	0.48	0.21	0.34	0.01	0.27	0.04

Discussion

We used several lines of transgenic poplars to investigate trade-off and causal links between hydraulic safety and the mechanical properties of the wood, and to investigate the genetic basis for vulnerability to embolism. These different transgenic lines were differently affected as regards the lignin metabolism: briefly, ASOMT transgenic poplars exhibit a strongly decreased S/G ratio and more condensed lignins (van Doorselaere et al., 1995; Lapierre et al., 1999); ASCAD transgenic poplars appear to be modified in the structure of the lignin polymer, which is likely to be more fragmented than in control plants (Lapierre et al., 1999). CCR down-regulated plants exhibit a patchy phenotype with orange spots where lignin content appears to be strongly reduced (up to 50%), whereas lignin content does not appear altered in wood areas without this colored phenotype. Finally, MYB expressing transgenic poplars have not been characterized for their altered lignin metabolism, but they exhibited a reduced growth, which we could tentatively relate to the reduced lignin content generally observed in tobacco expressing this same AmMYB308 gene (Tamagnone et al., 1998). Although these transgenic lines are not fully characterized for their xylem features, the different modifications in the lignin composition and structure offer many possibilities to test the role of the lignin in the mechanical and hydraulic properties, and in particular the trade-off between the two traits.

Transgenic poplars with severe reductions in xylem lignin contents were previously shown to have a reduced efficiency in water transport (Coleman et al., 2008; Kitin et al., 2010). Here, no transgenic line showed any difference in water status, no difference for ψ_m and ψ_p being detectable before and after watering. Likewise, we found no difference for xylem hydraulic conductivity between the lines (data not shown). Thus it seems that the changes in lignin composition in our transgenic lines did not affect the water transport, despite a drastic change in the lignin content (Coleman et al., 2008; Kitin et al., 2010). Moreover, we can exclude any variation in the water availability between the poplars lines in the course of the experiment, and thus any difference in acclimation to the water status between transgenic lines for vulnerability to cavitation. This had to be checked, since we previously showed that vulnerability to cavitation varied according to the water status of the poplar tree (Awad et al., 2010).

It has been hypothesized that stronger woods show higher resistance to drought and to vessel implosion (Hacke et al., 2001; Jacobsen et al., 2005). Also many studies have addressed the relationship between the hydraulic and mechanical stress adaptations, especially

Table 3. Vulnerability to cavitation and mechanical properties of the transgenic poplars in Exp. 1 and Exp. 2. The vulnerability to cavitation was evaluated by scoring the P_{50} values, xylem pressure inducing 50% loss of conductance, while the mechanical properties were evaluated by the Young's modulus. Each data represents the mean value (S.E.) from 4 to 5 leaves. Data that are significantly different from the control line (T89) according to an ANOVA ($P < 0.05$) are indicated with an asterisk (*).

Line	717-1b4	CCR- 62.13fas	CCR- 52.3fs	70ASCAD 25.1	70ASCAD 34.2	ASOMT 10b	ASOMT 2b	MYB308- 25.1	MYB308- 12.3	SCAD1										
Exp1																				
P_{50} (MPa)	2.05	0.04	1.97	0.11	1.73	0.08	1.87	0.13	1.92	0.07	1.92	0.08	1.94	0.08	2.03	0.08	1.84	0.19	1.90	0.02
Young's modulus (MPa)	10634	571	8025	119	8691	251	7614	679	10369	683	9773	304	9472	501	10729	675	10181	960	11545	159
Exp2																				
P_{50} (MPa)	2.55	0.09	2.35	0.12	2.46	0.01	2.36	0.06	2.33	0.06	2.23	0.02	2.18	0.04	2.21	0.03	2.43	0.05	2.42	0.08
Young's modulus (MPa)	9909	408	8706	575	9872	624	8841	359	10357	354	10196	312	9004	440	11417	607	10809	981	40432	497

the trade-off between hydraulic conductivity (efficiency) and mechanical strength. Nevertheless, it can easily be demonstrated that this simple trade-off cannot be explained by physical considerations: according to the Hagen-Poiseuille law, the hydraulic conductance scales with the fourth power of the vessel radius and leads to large vessels. On the other hand, for a given biomass production (the amount of cell walls), the best way to increase the stem rigidity is to increase its diameter and not to increase the local Young's modulus of the material by way of thicker cell walls. Thus on the contrary, the theoretical optimization of the anatomical structure would lead to an increase in the stem diameter by way of a very porous xylem made of very large conduits and thin cell walls. It is clear that the key point cannot be this hydraulic conduction - Young's modulus trade-off (Kern et al. 2005) and research work is accordingly now focused on the hydraulic safety function (Rosner et al., 2008; Utsumi et al., 2010; Pratt et al., 2007). Seeking a relation between resistance to cavitation (and/or implosion) and mechanical strength, researchers found a positive correlation at both within- and between-species levels. They also found that the two parameters were positively correlated with the wood density. However, our data on the transgenic poplar lines do not support this trade-off, although we observed variations for both traits at a similar range. They showed no relationship, neither positive nor negative, between resistance to cavitation (P_{50}) and longitudinal mechanical properties (Young's modulus, Fig. 1). In the first experiment (Exp. 1), we found significant differences between lines for the mean of Young's modulus, such as 70ASCAD25.1, CCR-62.13fas13 and CCR-52.3fs, which showed lower elastic properties than the control line, but only the CCR-52.3fs showed a statistically higher P_{50} value. By contrast, in the second experiment (Exp. 2), the six lines that were significantly more vulnerable to cavitation compared with the control line showed either more or less favorable mechanical properties and clearly not necessarily the worst mechanical properties. Only line MYB308-25.1 showed better mechanical properties and vulnerability to cavitation than the control line 717-1b4, at variance with the positive correlation described by others (Rosner et al., 2008; Utsumi et al., 2010; Pratt et al., 2007). To support the lack of trade-off between the two traits, we observed an acclimation for P_{50} but not for the Young's modulus between the two experiments (Fig. 1A and B). The P_{50} mean value decreased significantly ($P < 0.001$) from -1.91 MPa in Exp1 to -2.35 MPa in Exp. 2, whereas the Young's modulus mean values in Exp.1 (9495 MPa) and in Exp. 2 (9934 MPa) were not significantly different ($P = 0.158$). The correlation between P_{50} and Young's modulus was also tested per plant for each experiment (data and figures not shown). There was no correlation, and the linear regression was not significant. However, we have to distinguish between the wood of conifers

Table 4. Anatomical parameters of the xylem from the ASOMT10b and ASOMT2b lines. Each data point represents a mean value (± S.E.) from 4 to 5 plants, with six stem sections per plant. For each data line, values followed by different letters are significantly different according to an ANOVA analysis at $P \leq 0.05$. Vessel diameter, area fraction occupied by vessels (A_v), vessel density and implosion resistance index $(t/b)^2$.

Parameter	Exp. 1						Exp. 2					
	717-1b4		ASOMT 10b		ASOMT 2b		717-1b4		ASOMT 10b		ASOMT 2b	
Vessel diameter (μm)	21.39	0.36 ^a	21.03	0.59 ^a	21.42	1.08 ^a	21.10	0.35 ^a	21.46	1.04 ^a	22.00	1.07 ^a
A_v (%)	7.90	2.02 ^a	8.23	1.58 ^a	8.59	1.33 ^a	7.76	0.77 ^a	7.76	0.77 ^a	8.77	1.63 ^a
Vessel numerical density (mm ⁻²)	12.30	3.02 ^a	13.10	2.39 ^a	13.57	2.01 ^a	12.14	1.22 ^a	12.26	2.80 ^a	13.86	2.18 ^a
$(t/b)^2$ (10 ⁻³)	9.7	3.3 ^a	7.0	1.7 ^b	7.0	2.2 ^b	8.7	2.9 ^a	4.9	1.6 ^b	3.9	0.9 ^b

and that of angiosperms. In conifers, the same cells have to deal with both mechanical and hydraulic considerations and the cells that compose the surrounding material of a conducting tracheid are similar. In angiosperms, cells are specialized, with vessels that support hydraulic function and surrounding cells that are responsible for most of the macroscopic wood mechanical behavior. Hence the angiosperm xylem structure has many possibilities and it is easy to conceive that a change of lignin structure in the cell wall can affect hydraulic properties without modifying the mechanical properties, and *vice versa*.

At the tissue level, longitudinal wood mechanical behavior is mainly linked to material porosity, i.e. the ratio between the lumen area and the cell wall area. Assuming, as is generally accepted, that the cell wall density is constant, we arrive at the well-known positive relationship between density and wood elasticity that partially contributes to the relationship between latewood percentage and mechanical behavior. To a lesser extent, the density is also correlated with the transversal mechanical properties of wood, but this relationship is much more complex and involves the anisotropy of the cellular structure (Gibson and Ashby 1999). Our results show no significant difference between the transgenic lines for the wood density, except for the line SCAD1 (Fig. 2B), nor any correlation between the density and the Young's modulus (data not shown). Consequently, the mechanical behavior of the 70ASCAD-25.1, CCR-62.13fas13, CCR-52.3fs and MYB308-25.1 lines can be explained by a modification of their specific Young's modulus (Fig.2A), which can be regarded as an intrinsic cell wall property. The cellulose microfibril angle and cell wall chemistry are the main parameters that determine the wall properties (Cave, 1968; Person, 2000; Gindl, 2001; Mencuccini et al., 1997; Jagels et al., 2003; Jagels and Visscher, 2006). Lignins are randomly oriented in the polymer in the form of a rigid amorphous polymer matrix that is responsible for the stiffening of the cell wall and for the resistance to compression (Gindl 2002). Modifying lignin should necessarily modify the cell wall properties in an isotropic way, i.e. the xylem properties in the three directions, so leading to changes in longitudinal mechanical properties. In agreement with our results, Hepworth and Vincent (1998) showed that transgenic tobacco with a lower CAD activity modified lignin and reduced the Young's modulus without changing fibre diameter or length. Similarly, Bernard-Vailhe et al (1996) showed that changes in the type of lignin inter-unit linkage could be responsible for reducing the mechanical properties of the cell wall. Thus we can reasonably assume that the lignin modification in the 70ASCAD-25.1, CCR-62.13fas13, CCR-52.3fs and MYB308-25.1 lines changed the mechanical properties of the wall.

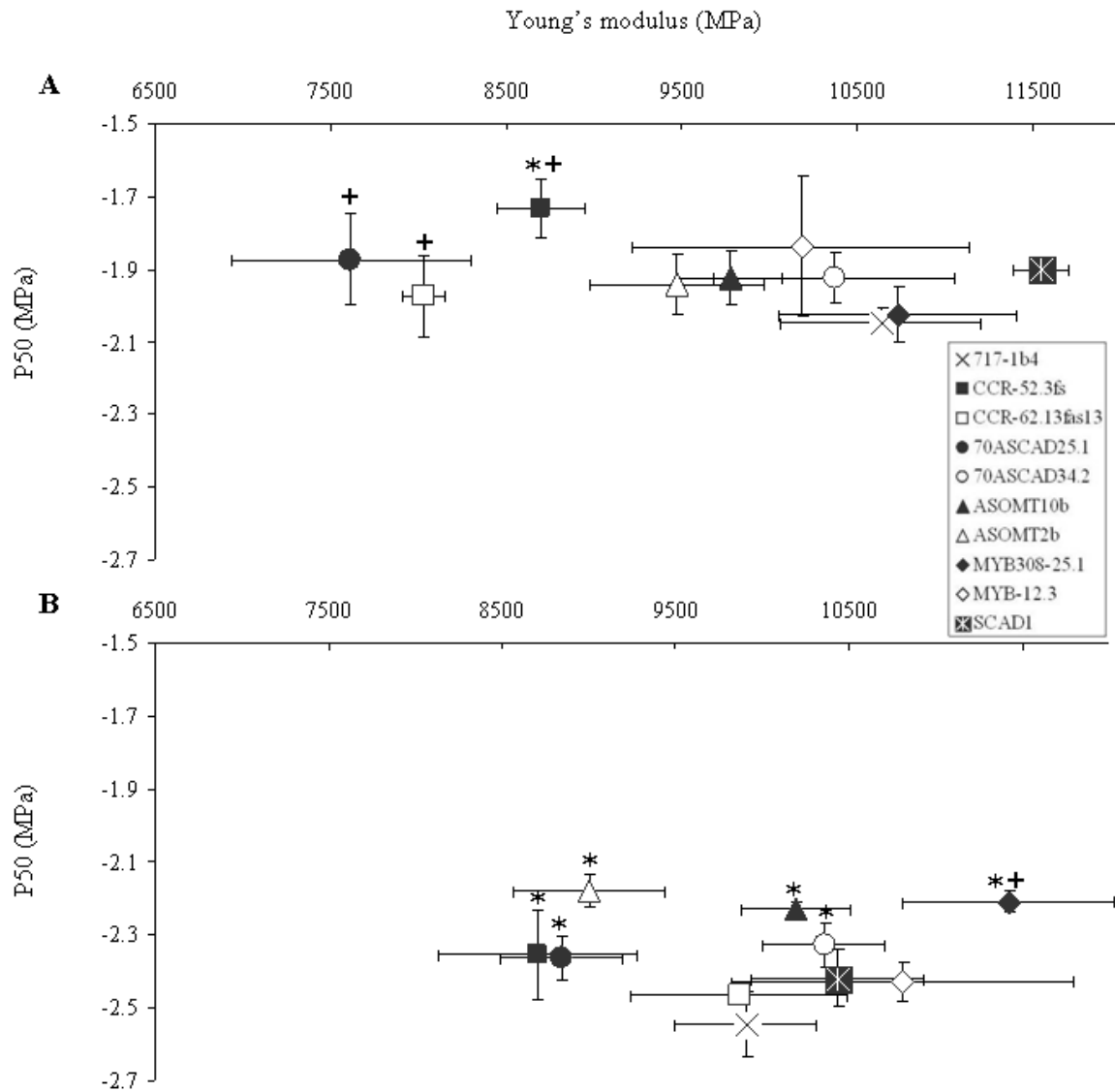


Fig. 1. Correlation between Young's modulus and P_{50} (xylem pressure causing 50% loss of hydraulic conductance) in the transgenic poplar lines, in Exp. 1 (A) and Exp. 2 (B). Each dot represents data for one transgenic line for both the Young's modulus and the P_{50} values. Data are mean values (\pm S.E.) from 4 to 5 plants. The linear regression was not significant at $P = 0.05$. Data significantly different between transgenic lines and the control 717-1b4 line are indicated by an asterisk (*) for P_{50} and a cross (+) for Young's modulus.

Another interesting finding in this work is the increase in xylem vulnerability to cavitation in some transgenic lines with modified lignin composition compared with the control lines, without any change in mechanical properties. Drought-induced cavitation in xylem is thought to occur when an air bubble penetrates a pit wall (Zimmerman, 1983; Cochard et al., 1992; Cochard, 2006). Hence it is well-accepted that the vulnerability to cavitation relies on the pit properties. However, studies on the molecular and genetic basis of cavitation resistance are scarce. It has been demonstrated that the pectin-bound calcium is important for xylem vulnerability to cavitation (Herbette and Cochard, 2010) and a role of lignin has been suggested in xylem vulnerability to cavitation (Colemann et al., 2008). In this last study, a decrease in the xylem lignin content in transgenic poplars resulted in an increase in vulnerability to cavitation. However, the xylem was collapsed in these transgenic plants, and this constitutes a bias in the experimental measure of the vulnerability to cavitation. The vulnerability to cavitation is estimated through the cavitation-induced loss of conductance, and the xylem collapse reduces the conductance regardless of cavitation events. Further, the xylem collapse can weaken the pit structure and make it more vulnerable. Here, the ASOMT10b and ASOMT2b lines exhibited an increase in vulnerability to cavitation compared with the control line (Fig.1B), but with no xylem collapse before or after cavitation events (data not shown). This difference can be explained by four non-exclusive hypotheses. The first hypothesis relates to the pit membrane composition. On the one hand, lignins have been detected in the pit membrane of beech xylem (Fromm et al., 2003). The middle lamella in xylem tissue contains much lignin (more than 60%), and the primary wall has the highest concentration of lignin, the S2 layer containing in proportion the lowest level (around 25%) (Navi and Heger, 2005). On the other hand, there is experimental evidence for a role of the mechanical properties of the pit membrane in the cavitation process (Choat et al., 2004; Sperry and Hacke, 2004). Thus it is very plausible that a modification in the lignin composition could slightly affect the pit membrane behavior with or without significant impact on the mechanical properties as for ASOMT2b and ASOMT10b lines.

The second hypothesis relates to the pit membrane thickness. The down-regulation of the COMT genes in these transgenic poplars induced a down-regulation of many other genes involved in the primary wall metabolism, especially in pectin and hemicellulose metabolism (Fig.3): two pectin methylesterases (PME), two polygalacturonases, three UDP-glucose dehydrogenases and two xylan synthases. Each of the investigated isoforms has been found to be specifically expressed during the xylogenesis (Hertzberg et al., 2001). We can also assume that this xylem-specific down-regulation of the primary wall components could result in a

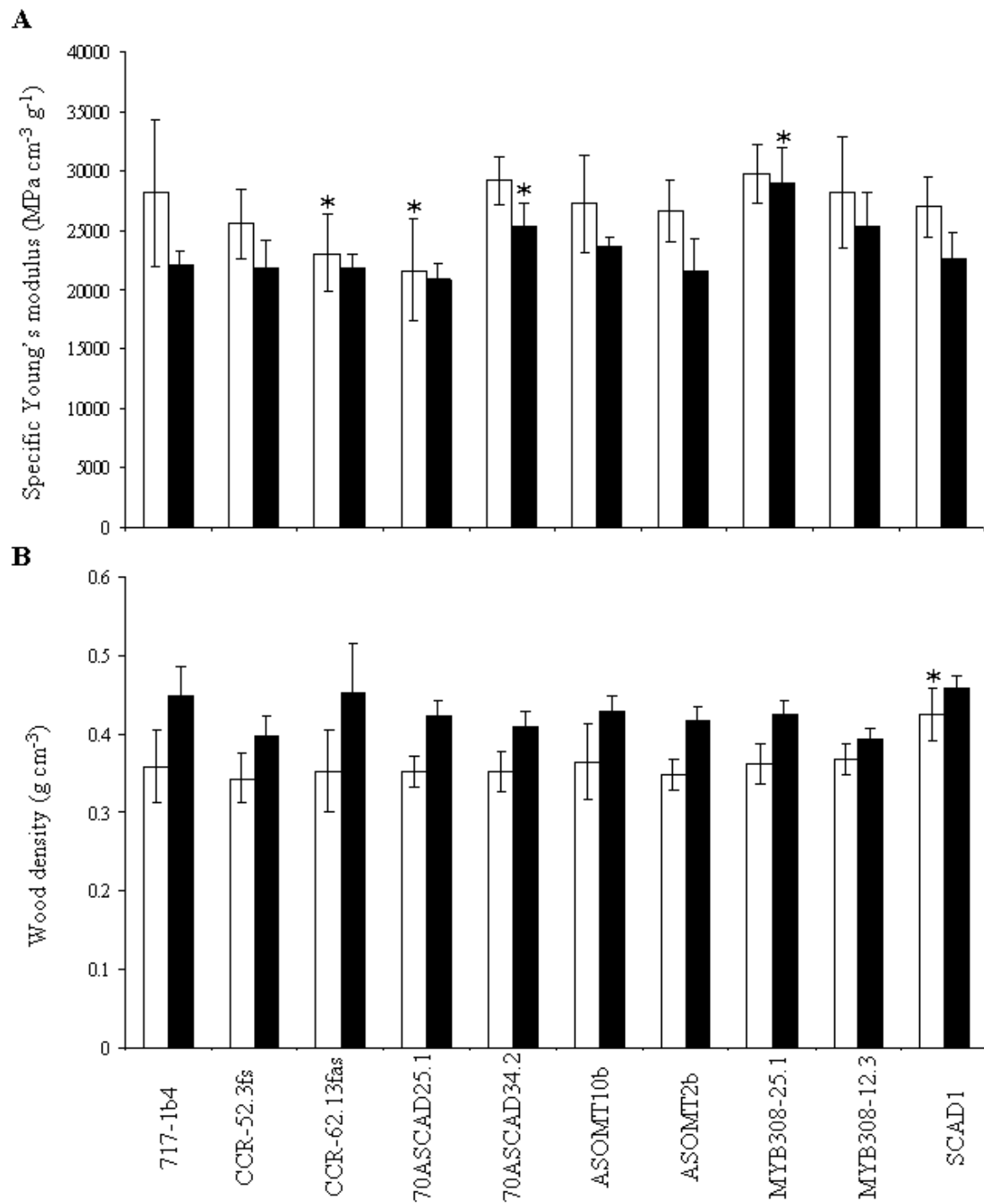


Fig. 2. Specific Young's modulus (A) and wood density (B) in transgenic poplar lines. Open bars represent Exp. 1 and closed bars Exp. 2. Data are mean values (\pm S.E.) from 4 to 5 samples. Data significantly different between transgenic lines and the control 717-1b4 line are indicated by an asterisk (*).

weakened pit membrane, i.e. one more vulnerable to cavitation events, without affecting the longitudinal mechanical properties, which rely mainly on the prevailing secondary wall. Although these two hypotheses are the most likely, we cannot rule out two others.

The third hypothesis relates to the "rare pit" hypothesis, also called the "pit area hypothesis". It states that pits with pores of air-seeding size are very rare compared with the great majority of pits with much narrower air-tight pores (Hargrave et al., 1994; Choat et al., 2003; Wheeler et al., 2005). Because of this, the vulnerability of a given conduit is heavily influenced by the area of pit membrane it contains: the larger the pit membrane area, the higher the probability that it contains a vulnerable pit; this leads to the vulnerability of the complete conduit. Evidence supporting this hypothesis includes the often observed rarity of pit membrane pores of air-seeding size, the lack of consistent correlation between indicators of mean membrane pore size and vulnerability to cavitation, and a significant correlation between inter-conduit pit area and vulnerability to cavitation (Hargrave et al., 1994; Choat et al., 2003; Wheeler et al., 2005; Hacke et al., 2006; Jansen et al., 2009). In the context of this rare pit hypothesis, we may venture the hypothesis that the ASOMT10b and ASOMT2b lines have longer vessels and/or larger pits, since vessel diameters were unchanged in the poplar lines (Table 4). This would increase the vessel wall area and thus the pit area, which would lead to plants that are more vulnerable to cavitation.

The fourth hypothesis involves transversal mechanical properties of the xylem. Hacke et al. (2001) suggest that plants that exhibit a high degree of cavitation resistance and that experience greater negative pressures, show thicker vessel walls relative to their lumen diameter, i.e. a higher $(t/b)^2$ index, which would be a way to resist transverse buckling of the conduits. Considering an isolated vessel, its implosion resistance mechanically increases with the decrease in vessel lumen diameter and/or an increase in wall thickness, and its tangential wall properties. Our anatomical measurements show that a large decrease in the $(t/b)^2$ index for ASOMT10b, ASOMT2b is mainly due to the thinning of the wall and not the increase in the vessel lumen diameter (Table 4). However, at the xylem tissue level, the vessel resistance is related not only to its diameter, but also to the transversal mechanical properties of the surrounding tissues.

Modifications of the lignin composition in a number of transgenic poplars has enabled us to demonstrate that the correlation usually observed between vulnerability to cavitation and the mechanical properties does not rely on a trade-off, or only in part. Further analyses of the macromolecular structure on these transgenic plants are needed to understand what changes of lignin modifications could affect either the vulnerability to cavitation or the mechanical

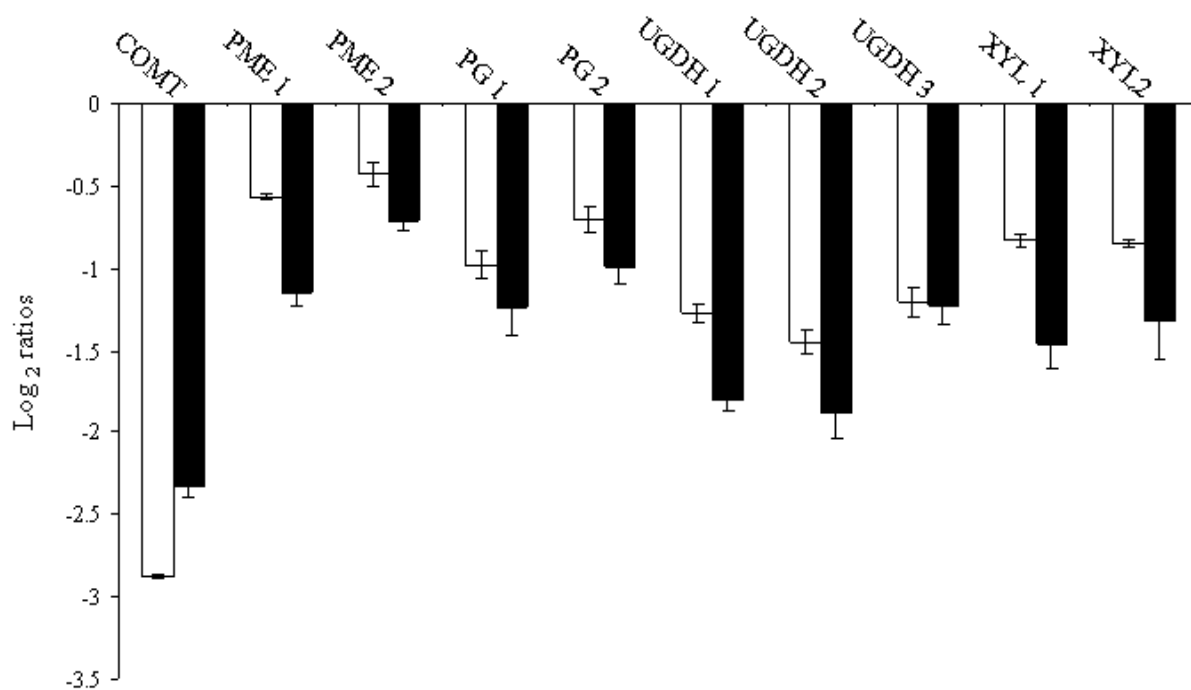


Fig. 3. Quantitative real time PCR (QPCR) analysis of the relative transcript abundance of genes from wall metabolism in ASOMT10b and ASOMT2b lines. Relative transcript abundance was expressed as the ratio of gene expression level in ASOMT10b (open bars) or in ASOMT2b (closed bars) compared with the control line 717-1b4 in Exp1. The names of the genes investigated, with their accession numbers and the sequences primers are given in Table 3. Each data point represents a mean value (S.E.) from 3 replicates.

properties. We report evidence that lignins are involved in the vulnerability to cavitation, probably through modifications of the pits. To date, pit function in xylem hydraulics has been exclusively restricted to the pectin components, and this study opens new avenues of research in pit function related to the lignins. To gain a better understanding of the role of pits in hydraulic efficiency and safety, further research should address the composition of pits in relation to the hydraulic traits, and consider the role of lignins.

Acknowledgments

We thank Cathy Martin (John Innes Centre, Norwich, UK), who kindly provided us with the pJAM495 construct carrying the AmMYB308 gene, and Christelle Boisselet for technical help.

References

- Awad H, Barigah T, Badel E, Cocharda H, Herbette S** (2010) Poplar vulnerability to xylem cavitation acclimates to drier soil conditions. *Physiologia Plantarum*. ISSN 0031-9317.
- Baucher M., Chabbert B., Pilate G., VanDoorselaere J., Tollier MT., PetitConil M., Cornu D., Monties B., VanMontagu M., Inze D., Jouanin L., Boerjan W.** (1996), Red xylem and higher lignin extractability by down-regulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar *Plant physiol.* **112**: 1479-1490
- Bernard-Vailhe MA, Cornu A, Robert D, Maillot MP, Besle JM** (1996) Cell wall degradability of transgenic tobacco stems in relation to their chemical extraction and lignin quality, *J. of Agric. Food Chem.* **44**: 1164-1169
- Boudet AM, Lapierre C, Grima-Pettenati J** (1995) Biochemistry and molecular biology of lignification. *New Phytologist* **129**: 203-236
- Brodrribb TJ, Cochard H** (2009) Hydraulic Failure Defines the Recovery and Point of Death in Water-Stressed Conifers. *Plant Physiology* **149**: 575-584
- Brodrribb TJ, Holbrook NM** (2005) Water stress deforms tracheids peripheral to the leaf vein of a tropical conifer. *Plant Physiology* **137**: 1139-1146
- Cave ID** (1968) The anisotropic elasticity of the plant cell wall. *Wood Sciences and Technology* **2**: 268-278.
- Chabannes M, Ruel K, Yoshinaga A, Chabbert B, Jauneau A** (2001) *In situ* analysis of lignins in transgenic tobacco reveals a differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels. *Plant Journal* **28**: 271–282
- Chang C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EM** (1993) Arabidopsis ethylene-response gene ETR1. Similarity of product to two-component regulators. *Science* **262**: 539-544
- Choat B, Ball M, Luly J, Holtum J** (2003) Pit membrane porosity and water stress-induced cavitation in four co-existing dry rain forest trees species. *Plant Physiol* **131**: 41-44
- Choat B, Jansen S, Zwieniecki MA, Smets E, Holbrook NM** (2004) Changes in pit membrane porosity due to deflection and stretching: the role of vested pits. *J.EXP.Bot* **25**: 815-819
- Christensen-Dalsgaard KK, Fournier M, Ennos AR, Barfod AS** (2007) Changes in vessel anatomy in response to mechanical loading in six species of tropical trees *New Phytologist* **176**: 610-622

- Cochard H** (2002) A technique for measuring xylem hydraulic conductance under high negative pressures. *Plant Cell Environ* **25**: 815–819
- Cochard H** (2006) Cavitation in trees. *C R Phys* **7**:1018–1026
- Cochard H, Cruizat P, Tyree MT** (1992) Use of positive pressures to establish vulnerability curves. Further support for the air-seeding hypothesis and implications for pressure-volume analysis. *Plant Physiology* **100**: 205-209
- Cochard H, Froux F, Mayr FFS, Coutand C** (2004) Xylem wall collapse in water-stressed pine needles. *Plant Physiology* **134**: 401-408
- Cochard H, Gaele D, Bodet C, Tharwat I, Poirier M, Améglio T** (2005) Evaluation of a new centrifuge technique for rapid generation of xylem vulnerability curves. *Physiol Plant* **124**: 410–418
- Coleman HD, Lacey SA, Robert DG, Shawn DM** (2008) Perturbed Lignification Impacts Tree Growth in Hybrid Poplar-A Function of Sink Strength, Vascular Integrity, and Photosynthetic Assimilation. *Plant Physiology* **148**: 1229–1237
- Dean JFD, Eriksson K-E** (1992) Biotechnological modification of lignin structure and composition in forest trees. *Holzforschung* **46**: 135-147
- Freudenberg K, Neish AL** (1968) Constitution and Biosynthesis of Lignin. Springer, New York: **129**
- Fromm J, Rockel B, Lautner S, Windeisen E, Wanner G** (2003) Lignin distribution wood cell walls determined by TEM and backscattered SEM techniques. *Journal of Structural Biology* **143**: 77–84
- Gartner BL** (1991a) Is the climbing habit of poison oak ecotypic? *Functional Ecology* **5**: 696-704
- Gartner BL** (1991b) Stem hydraulic-properties of vines vs shrubs of western poison oak. *Toxicodendron diversilobum*. *Oecologia* **87**: 180-189
- Gartner BL** (1991c) Structural stability and architecture of vines vs shrubs of poison oak. *Toxicodendron diversilobum*. *Oecologia* **72**: 2005-2015
- Gibson LJ, Ashby MF** (1999) Cellular solids, structure and properties. 2nd ed. Cambridge University Press, 510p
- Gindl W** (2001) The effect of lignin on the moisture-dependent behavior of spruce wood in axial compression. *J. Mat. Sci. Lett.* **20**: 2161-2162
- Gindl W** (2002) Comparing mechanical properties of normal and compression wood in Norway spruce: The role of lignin in compression parallel to the grain, *Holzforschung*, **56** (4): 395-401

- Hacke UG, Sperry JS, Pockman WT, Davis SD, McCulloh KA** (2001) Trends in wood density and structure are linked to prevention of xylem implosion by negative pressure. *Oecologia* **126**: 457-461
- Hacke UG, Sperry JS, Wheeler JK, Castro L** (2006) Scaling of angiosperm xylem structure with safety and efficiency. *Tree Physiology* **26**: 689-701
- Hargrave KR, Kolb KJ, Ewers FW, Davis SD** (1994) Conduit diameter and drought-induced embolism in *Salvia mellifera* Greene (Labiatae). *New Phytologist* **126**: 695–705.
- Harkin JM** (1967) Lignin: a natural polymeric product of phenol oxidation. In WI Taylor, AR Battersby, eds, *Oxidative Coupling of Phenols*. Marcel Dekker, New York, pp 243–321
- Hepworth DG, Vincent JFV** (1998) The mechanical properties of xylem tissue from tobacco plants. *Annals of Botany* **81**: 751-759
- Hepworth DG, Vincent JFV** (1999) The growth response of the stems of genetically modified tobacco plants (*Nicotiana tabacum* 'Samsun') to flexural stimulation. *Annals of Botany* **83**: 39-43
- Herbette S, Cochard H** (2010) Calcium Is a Major Determinant of Xylem Vulnerability to Cavitation. *Plant Physiology* **153**: 1–8
- Hertzberg M, Aspeborg H, Schrader J, Andersson A, Erlandsson R, Blomqvist K, Bhalerao R, Uhlén M, Teeri TT, Lundberg J, Sundberg B, Nilsson P, Sandberg G** (2001) A transcriptional roadmap to wood formation. *PNAS* **98**: 14732-14737.
- Jacobsen AL, Ewers FW, Pratt RB, Paddock WA, Davis SD** (2005) Do xylem fibers affect vessel cavitation resistance? *Plant Physiology* **139**: 546-556
- Jagels R, Visscher GE** (2006) A synchronous increase in hydraulic conductive capacity and mechanical support in conifers with relatively uniform xylem structure. *American Journal of Botany* **93**: 179-187
- Jagels R, Visscher GE, Lucas J, Goodell B** (2003) Paleo-adaptive properties of the xylem of *Metasequoia*: mechanical /hydraulic compromises. *Ann. Bot* **92**: 79–88
- Jansen S, Choat B, Pletsers A** (2009) Morphological variation of intervessel pit membranes and implications to xylem function in angiosperms. *American Journal of Botany* **96**: 409–419.
- Kern K, Ewers F, Telewski F, Koeler L** (2005) Mechanical perturbation affects conductivity, mechanical properties and aboveground biomass of hybrid poplars. *Tree Physiol.* **25**, 1243-1251.

- Kitin P, Voelker SL, Meinzer FC, Beeckman H, Strauss SH, Lachenbruch B** (2010) Tyloses and Phenolic Deposits in Xylem Vessels Impede Water Transport in Low-Lignin Transgenic Poplars: A Study by Cryo-Fluorescence Microscopy. *Plant Physiology* **154**: 887–898
- Lapierre C, Pilate G, Pollet B, Mila I, Leplé J-C, Jouanin L, Kim H, Ralph J**, 2004. Signatures of cinnamyl alcohol dehydrogenase deficiency in poplar lignins, *Phytochemistry*, 65: 313-321
- Lapierre C, Pollet B, Petit-Conil M, Toval G, Romero J, Pilate G, Leplé J-C, Boerjan W, Ferret V, De Nadai V, Jouanin L** (1999) Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyl-transferase activity have opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. *Plant Physiology* **119**: 153–163
- Leplé J-C, Brasileiro ACM, Michel MF, Delmotte F, Jouanin L** (1992) Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Rep* **11**:137-141
- Leplé J-C, Dauwe R, Morreel K, Storme V, Lapierre C, Pollet B, Naumann A, Kang KY, Kim H, Ruel K, et al** (2007) Downregulation of cinnamoylcoenzyme A reductase in poplar: multiple-level phenotyping reveals effects on cell wall polymer metabolism and structure. *Plant Cell* **19**: 3669–3691
- Leplé J-C, Grima-Pettenati J, Van Montagu M, Boerjan W** (1998) A cDNA encoding cinnamoyl-CoA reductase from *Populus trichocarpa* (Accession No. AJ224986) (PGR98-121). *Plant Physiology* **117**: 1126
- Lichtenegger H, Reiterer A, Stanzl-Tschegg SE, Fratzl P** (1999) Variation of cellulose microfibril angles in softwoods and hardwoods - A possible strategy of mechanical optimization. *Journal of Structural Biology* **128**: 257-269
- Lindström H, Evans JW, Verrill SP** (1998) Influence of cambial age and growth conditions on microfibril angle in young Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Holzforschung* **52**: 573–581
- Maherali H, Pockman WT, Jackson RB** (2004) Adaptive variation in the vulnerability of woody plants to xylem cavitation. *Ecology* **85**: 2184-2199
- Mai J, Herbette S, Vandame M, Kositsup B, Kasemsap P, Cavaloc E, Julien JL, Améglio T, Roeckel-Drevet P** (2009) Effect of chilling on photosynthesis and antioxidant enzymes in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. trees **23**: 863-874
- McDowell N, Pockman WT, Allen CD, Breshears DD, Cobb N, Kolb T, Plaut J, Sperry**

- J, West A, Williams DG, Yopez EA** (2008) Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytologist* **178**: 719-739
- Mencuccini M, Grace J, Fioravanti M** (1997) Biomechanical and hydraulic determinants of tree structure in scots pine. Anatomical characteristics. *Tree Physiology* **17**: 105-113
- Meylan BA, Probine MC** (1969) Microfibril angle as a parameter in timber quality assessment. *For. Prod. J* **19**: 31–34
- Morizet J, Mingeau M** (1976) Effect of environment on water-uptake, as studied on beheaded exuding tomato.1. Role of nutrients. *Ann Agron* **27**: 183–205
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473–492
- Navi P, Heger F** (2005) Comportement thermo-hydrromécanique du bois. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne
- Niklas KJ** (1992) 10. Biomechanics and plant evolution. *In* Plant biomechanics. An engineering approach to plant form and function. University of Chicago Press, Chicago, pp 474-573
- Niklas KJ** (1997) Mechanical properties of black locust (*Robinia pseudoacacia*) wood. Correlations among elastic and rupture moduli, proportional limit, and tissue density and specific gravity. *Annals of Botany* **79**: 479-485
- Nualpun S, Pluang S, Russell FD, Wallie S** (2005) Molecular cloning of a new cDNA and expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene from *Hevea brasiliensis*. *Planta* **221**: 502–512
- Pammenter NW, Van Der Willigen C** (1998) A mathematical and statistical analysis of the curves illustrating vulnerability of xylem to cavitation. *Tree Physiology* **18**: 589-593
- Persson K** (2000) Micromechanical modelling of wood and fiber properties. Thesis, Lund University Press, 213p
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29(9)**: e45
- Pilate, G., Guiney, E., Holt K., Petit-Conil M., Lapierre C., Leple JC., Pollet B., Mila I., Webster EA., Marstorp HG., Hopkins DW., Jouanin L., Boerjan W., Schuch W., Cornu D., Halpin C.** (2002) Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. *Nat. Biotech.* **20**: 607-612
- Pockman WT, Sperry JS** (2000) Vulnerability to xylem cavitation and the distribution of Sonoran desert vegetation. *American Journal of Botany* **87**: 1287-1299

- Pratt RB, Jacobsen AL, Ewers FW, Davis SD** (2007) Relationships among xylem transport, biomechanical and storage in stems and roots of nine Rhamnaceae species of the California chaparral. *New Phytologist* **174**: 787-798
- Rasband WS**, ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009
- Rosner S, Klein A, Muller U, Karlsson B** (2007) Hydraulic and mechanical properties of young Norway spruce clones related to growth and wood structure. *Tree Physiology* **27**: 1165–1178
- Rosner S, Klein A, Muller U, Karlsson B** (2008) Tradeoffs between hydraulic and mechanical stress responses of mature Norway spruce trunk wood. *Tree Physiology* **28**: 1179-1188
- Scholander P, Hammel H, Bradstreet E, Hemmingsen E** (1965) Sap pressure in vascular plants. *Science* **148**: 339–346
- Sperry JS, Hacke UG** (2004) Analysis of circular bordered pit function I. Angiosperm vessels with homogenous pit membranes. *American Journal of Botany* **91**: 369-385
- Tamagnone, L., Merida, A., Parr, A., Mackay, S., Culianez-Macia, F.A., Roberts, K., and Martin, C. (1998).** The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *Antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. *Plant Cell* **10**, 135–154.
- Tyree MT, Dixon MA** (1986) Water stress induced cavitation and embolism in some woody plants. *Physiologia Plantarum* **66**: 397-405
- Tyree MT, Engelbrecht BMJ, Vargas G, Kursar TA** (2003) Desiccation tolerance of five tropical seedlings in Panama. Relationship to a field assessment of drought performance. *Plant Physiology* **132**: 1439-1447
- Utsumi Y, Bobich EG, Ewers FW** (2010) Photosynthetic, hydraulic and biomechanical responses of *Juglans californica* shoots to wildfire. *Oecologia* **164**: 331:338
- VanDoorselaere J., Baucher M., Chognot E., Chabbert B., Tollier MT., PetitConil M., Leple JC., Pilate G., Cornu D., Monties B., VanMontagu M., Inze D., Boerjan W., Jouanin L.** (1995) A novel lignin in poplar trees with a reduced caffeic acid 5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase activity *Plant Journal* **8**: 855-864
- Wagner KR, Ewers FW, Davis SD** (1998) Tradeoffs between hydraulic efficiency and mechanical strength in the stems of four co-occurring species of chaparral shrubs. *Oecologia* **117**: 53-62
- Wheeler JK, Sperry JS, Hacke UG, Hoang N** (2005) Intervessel pitting and cavitation in

- woody Rosaceae and other vesselless plants: a basis for a safety versus efficiency trade-off in xylem transport. *Plant Cell Environ.* **28**: 800–812
- Whetten R, Sederoff R** (1991) Genetic engineering of wood. *For Ecol Manage* **43**:301-316
- Whetten R, Sederoff R** (1995) Lignin biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 1001-1013
- Woodrum CL, Ewers FW, Telewski FW** (2003) Hydraulic, biomechanical, and anatomical interactions of xylem from five species of *Acer* (Aceraceae). *American Journal of Botany* **90**: 693–699
- Zimmermann MH**, ed (1983) *Xylem structure and the ascent of sap*. Springer Verlag, Berlin

Chapitre 3 :

Vulnérabilité à la cavitation de peupliers transgéniques surexprimant une pectine méthylesterase

Cette étude fait l'objet d'un article en préparation en vue d'une soumission à une revue internationale à comité de lecture.

Transgenic poplars overexpressing a pectin methylesterase are less vulnerable to xylem cavitation

Hosam Awad^{1,2}, Anais Dusotoit-Coucaud^{1,2}, Aude Tixier^{1,2}, Tété Barigah^{1,2}, Ewa millerowicz³, Hervé Cochard^{1,2}, Stéphane Herbette^{1,2}.

¹ Université Blaise-Pascal, UMR 547 PIAF, F-63177 Aubière Cedex, France.

² INRA, UMR 547 PIAF, F-63100 Clermont-Ferrand Cedex 01, France.

³ Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Umea Plant Science Centre, SE 901 83 Umea, Sweden.

Corresponding author:

Stephane HERBETTE

Physique et Physiologie Integratives de l'Arbre Fruitier et Forestier (PIAF)

UMR INRA - Université Blaise-Pascal 547

24, avenue des Landais

F - 63177 AUBIERE cedex

Tel: +33(/0) 473 40 79 28

FAX: +33(/0) 473 40 79 16

stephane.herbette@univ-bpclermont.fr

Keywords: water stress, xylem cavitation, pectins, pectin methylesterases, pit membrane, calcium, hydraulic conductivity.

Résumé

Bien que la vulnérabilité à la cavitation du xylème soit un trait important pour la tolérance à la sécheresse des arbres, on manque de connaissances sur les bases génétiques de ce caractère. Il existe une preuve expérimentale du rôle du calcium dans la vulnérabilité à la cavitation du xylème. Les liaisons calcium-dépendantes entre les chaînes de pectines, s'établissent selon le taux de méthylation des pectines, qui est contrôlé par la pectine méthylestérase (PME). Dans cette étude, nous avons analysé les propriétés hydrauliques de deux lignées transgéniques surexprimant une PME afin de tester le rôle des PME et des pectines dans les propriétés hydrauliques des arbres, en particulier dans la vulnérabilité à la cavitation du xylème. Les peupliers transgéniques n'ont montré aucun changement de leur état hydrique, de leur conductance stomatique, de leur consommation d'eau ou de leur croissance, par rapport aux peupliers non transformés. Cependant, la surexpression de la PME induit une augmentation de la conductivité du xylème spécifique et une diminution de la vulnérabilité à la cavitation. Le rôle des PME dans la vulnérabilité à la cavitation est discuté sur la base des hypothèses sur les déterminants structurels de la vulnérabilité à la cavitation.

Abstract

Although the vulnerability to xylem cavitation would be an important trait for tree drought tolerance, knowledge is lacking on the genetic bases of resistance to xylem cavitation. There is an experimental evidence for the role of calcium in xylem vulnerability to cavitation. The calcium dependent cross-linkage between pectins chains is known to be depending on the methylation rate of pectins that is controlled by pectin methylesterases (PME). Here, we analysed the hydraulic properties of two transgenic lines overexpressing PME to test the role of PME and pectins in hydraulic properties of trees, especially in their vulnerability to xylem cavitation. Transgenic poplars showed no changes in their hydric status, their stomatal conductance, their water consumption or their growth, when compared to untransformed poplar. However, overexpression of PME resulted in an increase in xylem specific conductivity and a decrease in vulnerability to cavitation. The role of PME in vulnerability to cavitation is discussed in light of the hypotheses on the structural determinants for vulnerability to cavitation

Introduction

Water is transported in the xylem under negative pressure. Thus it is held in a metastable state, below its vapor pressure, a condition that increases the likelihood of cavitation events (Oertli, 1971; Pickard, 1981). Xylem cavitation is recognized as a major constraint affecting plants regularly exposed to water stress (Tyree and Sperry, 1989; Milburn, 1993). The structure of xylem vessels is seen as an important factor in determining the vulnerability of water stress-induced cavitation (Zimmermann, 1983). Xylem vessels are bounded by pit, through which water passes to move from one vessel to another. Pit membrane act as a finely porous filter, allowing the passage of water and nutrients while limiting the passage of air bubbles, pathogens, and particles between adjacent xylem vessels (Crombie et al., 1985). The primary cause of water stress-induced embolism is the penetration of air through pit membranes between adjacent vessels, a process known as the “air seeding” (Zimmermann, 1983; Sperry and Tyree, 1988), and would consequently be strongly influenced by the porosity of the pit membrane (Tyree and Sperry, 1988; Cochard, 2006). There is also experimental evidence for a role of the mechanical properties of the pit membrane in this cavitation process (Choat et al., 2004; Sperry and Hacke, 2004). Clearly, the structural, physical, and chemical properties of pit membranes are central to the determinism of vulnerability to cavitation.

Pit membranes are composed of a degraded primary cell wall and a middle lamella and thus they are thought to be composed of tightly inter-woven cellulose microfibrils in a matrix of hemicelluloses and pectin polysaccharides (Dixon, 2000). Lignins have also been detected in pit membrane (Fromm et al., 2003). To date, the biochemistry of intervessel pit membrane is poorly understood. Some physiological studies indicate a role of pectins in pit function. Indeed, the ionic composition of xylem sap can affect the maximum hydraulic conductivity (van Ieperen et al., 2000; Zwieniecki et al., 2001; Lopez-Portillo et al., 2005; Gasco et al., 2006). Ca^{2+} ions are a structural component of some pectins that plays a central role as it determines the supramolecular assembly of the pectic chains and the formation of a pectate gel. These calcium-dependent cross-linkages are dependent both on the degree and the distribution of methyl-esterified GalA units through the HG network (Willats et al., 2001). We previously demonstrated that removing calcium from the wall induced a sharp increase in xylem vulnerability to cavitation (Herbette and Cochard, 2010). According to this study, the between species difference in vulnerability to cavitation would be mainly explained by the calcium in the pit membrane. Thus Ca^{2+} and pectins appears a suitable target for the investigations of xylem vulnerability to cavitation.

Pectins form the structurally most complex family of polysaccharides in nature. It typically constitutes about 30% of primary walls in dicotyledonous plants and non-graminaceous (non-grass) monocots, and up to 5% of wood tissues (Mohnen, 2008). Pectins have been shown to be involved in plant growth, morphogenesis, organogenesis, development, cell–cell adhesion, defence, leaf abscission, fruit maturation and dehiscence, seed hydration, and ion binding (Ridley et al., 2001; Willats et al., 2001). The structural classes of pectic polysaccharides include the homogalacturonans (HG), the rhamnogalacturonans of type I (RG I), the rhamnogalacturonans of type II (RG II) and the rhamnogalacturonan-xylogalacturonans (XGA). The homogalacturonan is a linear polymer of the residue α (1,4) D-galacturonate, which may constitute over 60% of pectins in plant cell wall. The homogalacturonan is synthesized in the cis-Golgi, methyl-esterified in the medial-Golgi, substituted in the trans-Golgi and secreted in a highly methyl-esterified state (Zhang and Staehelin, 1992; Staehelin and Moore, 1995; Sterling et al., 2001). Then, pectin methylesterases (PME) act to release methyl groups and give rise to charged free carboxyl groups. When PMEs act randomly on homogalacturonans, the demethyl-esterification releases protons that promote the action of endopolygalacturonases (Moustacas et al., 1991) and contribute to cell wall loosening. When PMEs act linearly on homogalacturonans, they give rise to blocks of free carboxyl groups that could interact with Ca^{2+} , so cross-linking pectin chains to a gel (Goldberg et al., 1996). Because the action of endopolygalacturonases in such a gel is limited, this action pattern of PMEs contributes to cell wall stiffening. Two homogalacturonans chains can interact through calcium bridges. The hypothesized *in vivo* structure of the HG–calcium complex is sometimes referred to as the egg-box model (Liners et al., 1989).

PME is a multigene family with 89 and 67 genes identified in the genome of *Populus trichocarpa* and *Arabidopsis italiana*, respectively. The PME genes encode pre-pro-proteins that have specific peptide signatures. The pre-region or signal peptide is required for protein targeting to the endoplasmic reticulum. Then the pro-PME is secreted to the apoplast via Golgi network, and only the mature part of the PME (without the pro region) is found in the cell wall. Some studies in which PME expression has been modified indicate that it plays a role in wall stiffening and inhibition of wall plasticity (Wen et al., 1999; Hasunuma et al., 2004; Bosch et al., 2005), but others have found no evidence that it is involved in the regulation of symplastic growth and cell expansion (Tieman et al., 1992; Pilling et al., 2000, 2004). Transgenic hybrid aspen trees (*Populus tremula x tremuloides*) were generated in which expression of a wood specific PME was up- and down-regulated, with corresponding

changes in PME enzyme activities (Siedlecka et al., 2008). The trees with modified PME activity had altered degrees and patterns of HG methylesterification as well as changes in fibre diameters, and fibre lengths. The results demonstrated the role of this wood specific PME1 in intrusive growth and support the hypothesis that HG methylesterification plays an important role in the regulation of wall plasticity. Here, we have investigated the hydraulic properties of these transgenic lines overexpressing PME, to test the role of PME and pectins in hydraulic properties, especially in the xylem vulnerability to cavitation.

Material and methods

Plant material and culture conditions

The polar lines used in the study were reported by Siedlecka et al. (2008). The transgenic lines were obtained from the hybrid aspen (*Populus tremula* × *Populus tremuloides*) clone T89. The transgenic trees over-expressing the pttPME1 gene showed an increase of their PME enzyme activities. The up-regulated lines were called 2Bs and 7s and the control line was called T89.

Plants were multiplied clonally *in vitro* on Murashing and Skoog medium (Murashing and Skoog, 1962). When they reached 4 cm height, they were gradually acclimatized on hydroponic solution (Morizet and Mingeau, 1976) and grown in a controlled environment room: 16 hours daylight, at 21 - 22°C, 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (day) and 18 - 19°C (night) with 70 ± 10 % relative humidity. After they reached 57 days old and 30 cm height, they were transferred into 10 liters pots filled with a commercial soil (40 % black, 30 % brown and 30 % blond peat moss, pH 6.1, DUMONA-RN 75-3851 Arandon, Holland) and grown for 90 days in a greenhouse: 16 hours daylight, at 22 (± 1)°C, 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (day) and 19 (± 1)°C (night) with 70 ± 10 % relative humidity.

The water regime was controlled so that the plants were grown with a soil water content ranged between 40% and 75% of field capacity (FC). The soil water was evaluated by the measurement of the weight of the pots, and the plants were then watered every 3, 4 or 5 days.

Leaf water potentials and leaf stomatal conductance

The midday and predawn leaf water potentials (ψ_m and ψ_p) were measured using a pressure chamber (Scholander et al., 1965). Two leaves per plant were removed to gauge ψ_m and ψ_p . Predawn water potential was recorded between 04:00 and 06:00 am solar time and ψ_m was recorded between 12:00 and 14:00 pm solar time. The measurements were made at 50,

Table 1: Physiological parameters in stems and leaves from PME poplar lines scored at the end of the experiment. Each data represents a mean value (S.E.) from 6 to 10 plants. For each parameter, values not followed by the same letter differ significantly at $P \leq 0.05$ (one-way ANOVA).

Parameter	T89		2Bs		7s	
Plant height (cm)	124.2	3.9 ^a	124.6	4.5 ^a	128.6	2.2 ^a
Native embolism (%)	34.34	3.51 ^a	24.04	3.44 ^b	28.15	6.51 ^{ab}
Specific conductivity ($\text{mmol m}^{-1} \text{MPa}^{-1} \text{s}^{-1}$)	1.96	0.10 ^a	2.34	0.078 ^b	2.08	0.095 ^a
Stomatal conductance ($\text{mmol s}^{-1} \text{m}^{-2}$)	169.03	28.5 ^a	213.12	31.09 ^a	228.5	39.91 ^a

51, 82 and 83 days after the beginning of the experiment, just before watering (Days 50 and 82) and 1 day after watering (Days 51 and 83).

Leaf stomatal conductance (gs) was measured with an ADC Leaf Chamber Analyser LCA4 (Delta-T Devices Ltd., Cambridge, UK; Experiment 1). Measurements were made two times at 55 and 81 days after the beginning of the experiment, between 16.00 – 18.00 h, on one mature leave per tree.

Native embolism and specific conductivity

Native embolism (% of loss conductivity) and wood specific conductivity ($\text{mol MPa}^{-1} \text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$) were measured on 0.2m long samples using XYL'EM[®], a xylem embolism meter (Bronkhorst, Montigny-les-Cormeilles, France), following the procedure described previously (Cruiziat et al. 2002, Sperry et al. 1988). The technique involves measuring the hydraulic conductivity of segments before and after water refilling (K_i and K_{max} , respectively). Stem segments were excised under water and their ends cut with a sharp razor blade. The basal cut end was then attached to the hydraulic apparatus. The solution used was composed of 10 mM KCl and 1mM CaCl_2 . The solution flowed from a flask through the branch segment, which was kept under water during the measurement. We measured K_i and K_{max} under low pressure (6 kPa). Before measuring K_{max} , air obstructing stem xylem vessels was removed by applying a series of 5-min hydraulic pressure flushes (0.15 MPa).

Vulnerability curves

The vulnerability to xylem cavitation was assessed with the Cavitron technique (Cochard, 2002; Cochard et al., 2005). Its principle is as follows: a centrifugal force increases progressively the water tension in a xylem segment and the resulting loss of hydraulic conductance is measured in the same time. The curve of percentage loss of xylem conductance (PLC) versus xylem water tension represents the sample vulnerability to cavitation. Vulnerability curves were determined on one 0.28 m long sample per plant; i.e. 6-10 samples for each transgenic line. Xylem pressure (P) was first set to a reference pressure (-0.5 MPa) and the maximal conductance (K_{max}) of the sample was determined. The xylem pressure was then set to a more negative value for 3 minutes and the conductance (K) of the sample was re-measured. The percent loss conductance of the sample is then computed as:

$$\text{PLC} = 100 \times (1 - K / K_{\text{max}}). \quad \text{eqn (1)}$$

The procedure was repeated for more negative pressures (with -0.25 or -0.5 MPa step increments) until PLC reached at least 90 %. Rotor velocity was monitored with an electronic

Table 2: Vulnerability to cavitation parameters in PME poplar stems. P_{12} , P_{50} and P_{88} , xylem pressure causing 12, 50 and 88% loss of hydraulic conductance, respectively, were calculated from the vulnerability curves of each plant. Data are means (S.E.) from 6 to 10 plants. Values on each line not followed by the same letter differ significantly at $P \leq 0.05$ (one-way ANOVA).

Parameter	T89		2Bs		7s	
P_{50} (MPa)	-1.67	0.05 ^a	-1.94	0.05 ^b	-1.74	0.11 ^{ab}
P_{12} (MPa)	-1.01	0.09 ^a	-1.34	0.11 ^b	-1.16	0.21 ^{ab}
P (MPa)	-2.33	0.04 ^a	-2.53	0.11 ^a	-2.31	0.07 ^a
Slope (% MPa ⁻¹)	82.5	8.6 ^a	118.2	41.4 ^a	103.7	21.4 ^a

tachymeter (10 rpm resolution). The PLC curves were fitted using the following sigmoid function (Pammenter and van der Willigen, 1998):

$$PLC = 100 / (1 + e^{(s(P-P_{50})/25)}) \quad \text{Eqn (2)}$$

where P_{50} is the pressure causing 50% loss of hydraulic conductivity and s is the slope of the curve at this point (MPa^{-1}). To estimate xylem water potential causing 12 and 88% loss of conductivity (P_{12} and P_{88}) values: $P_{12} = P_{50} + 50/s$, called the ‘air entry point’ (Sparks and Black 1999), is interpreted as the xylem tension level at which runaway cavitation and embolism begin when the resistance to the air entry of pit membranes within the conducting xylem is overcome (Tyree and Sperry 1988). $P_{88} = P_{50} - 50/s$, the ‘full embolism point’, is interpreted as the limiting tension before the xylem becomes totally non-conductive (Domec and Gartner, 2001).

Results

To check if the water status in the transgenic poplars were modified; a survey of water consumption and leaf water potentials (Fig. 1 and 2) were conducted. The lines 2Bs and 7s showed no significant difference between them and with the control line T89 for the water consumption and for the ψ_m and ψ_p values. At the end of the experiment, several physiological tests were performed. Before collecting the samples, the plant heights and the stomatal conductance were scored (table 1), both traits showed no significant difference between the lines 2Bs and 7s and the line T89. Just after collecting stem samples, their specific conductivity and embolism rate were scored (table 1). The line 2Bs showed a higher specific conductivity and a lower embolism rate than the control line T89. Moreover, the 2Bs plants appeared to be significantly less vulnerable to cavitation than the T89 plants (table 2 and Fig. 3). A significant difference was also found for P_{12} between the line 2Bs and T89, whereas no significant difference was found for P_{88} values between the three lines. The slopes of the vulnerability curves were found no significantly difference for all lines (Table 2 and Fig. 3).

Discussion

When we investigated the hydraulic properties of the transgenic poplar lines overexpressing PME, we wanted to test the role of PME, pectins and calcium in these hydraulic properties, especially, the vulnerability to cavitation. In a previous study (Herbette and Cochard, 2010), they were tested the role of calcium in vulnerability to cavitation in *Fagus sylvatica* stems. Calcium sequestration in the stems increased their vulnerability to

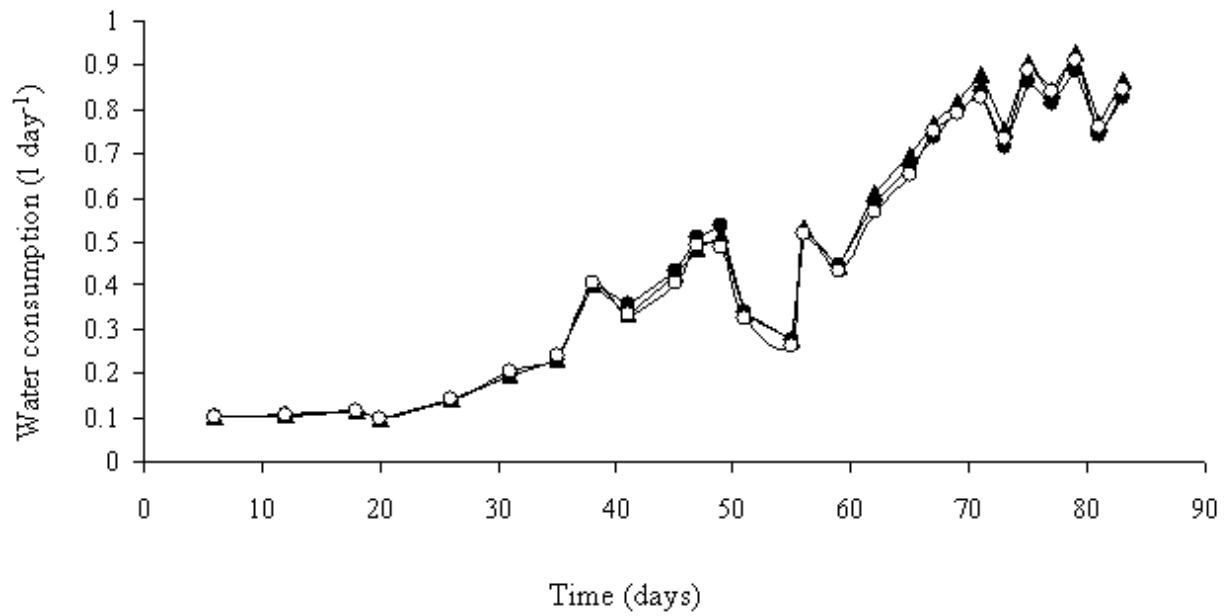


Fig. 1: Time course of water consumption during growth of PME poplars lines. The water consumption values were calculated on the T89 plants (closed triangles), 2Bs plants (closed circles) and 7s plants (open circles) for 20 times as indicated in methods section. Data are means (S.E.) from 6 to 10 plants. There is not significant difference between lines, according to an ANOVA analysis ($P > 0.05$).

cavitation. In the present study, the PME overexpression induced a decrease in vulnerability to cavitation supporting a role for this gene in the control of vulnerability to cavitation through pectin-bound calcium.

In poplar, the vulnerability to cavitation was previously shown to acclimate to the water regime and the water status of the tree (Awad et al., 2010). Thus, we have to check that any difference in vulnerability to cavitation between poplars lines is not due to an acclimation process. ψ_m and ψ_p have been considered as good indices for evaluating plant and soil water status (Shackel et al. 1997). The three poplar lines were grown under the same water regime and the water status of the plants was similar since we did not see differences in water consumption (Fig. 1) nor in ψ_m and ψ_p values before and after watering. So, we can reasonably exclude that the differences in vulnerability curves were due to an acclimation process (Awad et al., 2010). Then, it was essential to check the levels of native embolism across lines. A decrease in vulnerability to cavitation can artificially result from an increase in the embolism level. If transgenic lines would have higher level of embolism, the vulnerability curves would be plotted on the remaining functional vessels, which are the most resistant. The 2Bs line had lower level of native embolism and a lower vulnerability to cavitation, while the control line T89 had higher native embolism and a higher vulnerability to cavitation. Thus, we can exclude that the lower vulnerability to cavitation in the 2Bs line would due to experimental bias. More, the 2Bs line has probably a much lower vulnerability to cavitation than that observed.

Only the 2Bs line was found to be significantly more resistance to cavitation than the control line (T89), whereas this difference is weaker and not significant with the line 7s. This result is in agreement with the other results obtained by Siedlecka et al. (2008) on these lines. They showed that the 2Bs line is different than the control line T89 and the other line 7s for the degree of HG methylesterification (DM). 2Bs line showed a lower DM than 7s line and the control line T89. In addition, the 2Bs line showed the greatest differences for anatomical traits when compared to the control line T89. The 2Bs had the lowest wood fiber length and fiber width.

The observed decrease in vulnerability to cavitation due to PME over-expression can be explained by two non-exclusive hypotheses. One is the "rare pit" hypothesis, also called the "pit area" hypothesis. It states that pits with pores of air-seeding size are very rare compared to the great majority of pits with much narrower air-tight pores (Hargrave et al., 1994; Choat et al., 2003; Wheeler et al., 2005). Thus, the vulnerability of a given conduit is heavily influenced by the area of pit membrane it contains: the larger the pit membrane area

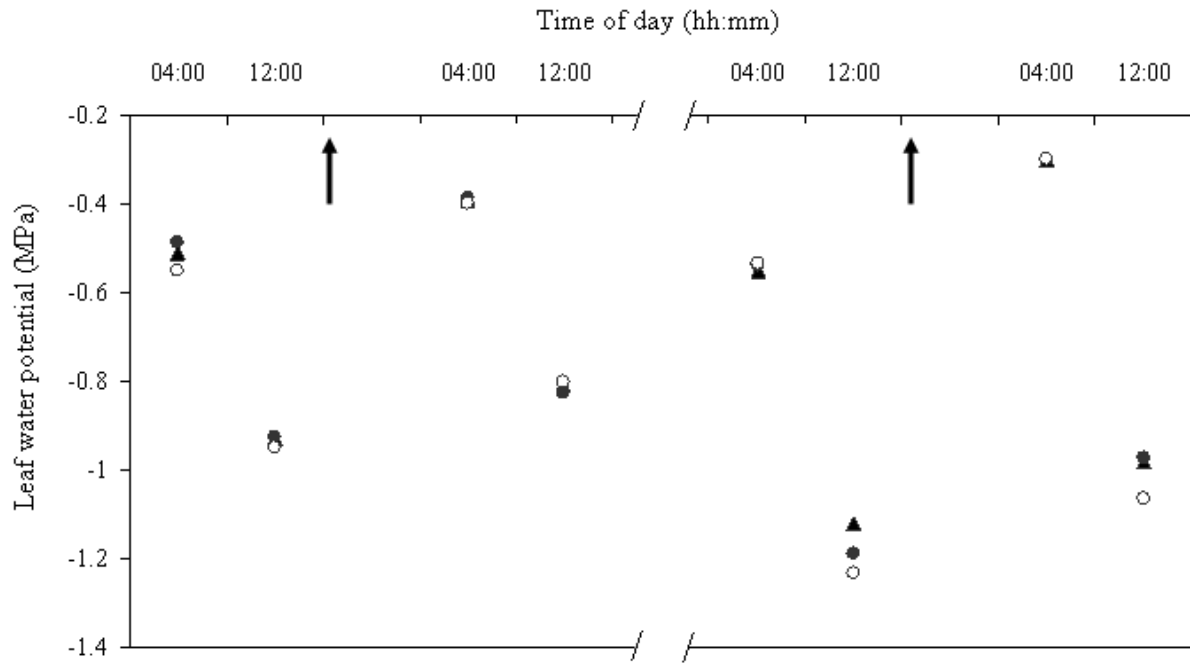


Fig. 2: Predawn and midday leaf water potentials (ψ and ψ_m) of PME poplars lines. The ψ and ψ_m values were measured on the T89 plants (closed triangles), 2Bs plants (closed circles) and 7s plants (open circles), at two periods separated by a break on the axis: 50-51 days (left) and 82-83 days (right) after the beginning of the experiment. The ψ were recorded between 04:00 and 06:00 solar time and the ψ_m were recorded between 12:00 and 14:00 solar time. The measurements were made just before irrigation, when the water soil content is minimal and the day after irrigation, when the water soil content is maximal. The watering between two measurements is indicated with an arrow. Each data represents the mean value (\pm S.E.) from 6 to 10 leaves. There is not significant difference between lines, according to an ANOVA analysis ($P > 0.05$).

is, the highest the probability it contains a vulnerable pit is; that leads to the vulnerability of the complete conduit. Pit membrane area has been found to be correlated to the vessel area (Lens et al., 2003, 2004, 2009; Sperry et al., 2006), and the PME are well known to regulate growth cell (Bosch and Hepler, 2005; Bosch et al., 2005; Parre and Geitmann, 2005). Thus, the PME could affect the area of pit membrane by regulating the vessel area. However, Siedlecka et al. (2008) demonstrated that there is no significant differences between the three lines (T89, 2Bs and 7s) for vessel length and diameter. Although we cannot exclude this “pit area” hypothesis, how the PME over-expression could affect the pit area remains unclear.

The most likely hypothesis is that PME would modify the pit membrane properties such as thickness, porosity and stretching. Water stress-induced cavitation is thought to occur when a tiny air bubble penetrates through a pit membrane, and would consequently be strongly influenced by the porosity of the membrane (Tyree and Sperry, 1988; Cochard, 2006). The anatomical observations indicate that reduced porosity may be achieved through greater pit membrane thickness (Jansen et al., 2009). Here, explain how PME or calcium and pectins could act on porosity or wall thickness (Bosch et al., 2005; Vincken et al., 2003). Moreover, pectin-bound calcium influences wall elasticity (Ezaki et al., 2005; Proseus and Boyer, 2006; Derbyshire et al., 2007). Many studies involving modified PME expression indicate that PME plays a role in wall stiffening and in the inhibition of wall plasticity (Wen et al., 1999; Hasunuma et al., 2004; Bosch et al., 2005). Moreover, the enzyme PME determines the number of sites where pectin chains are potentially cross-linked by calcium, and may thus strongly impact the mechanical properties of pit membranes (Pelloux et al., 2007). During the air seeding process, the pit membrane is exposed to a large pressure difference, and the membrane is forced to undergo substantial stretching or local deformations. This stretched state would allow air seeding to occur through enlarged pores in the pit membrane. Hence, the stretching properties of the pit membrane are considered as an important factor for vulnerability to cavitation (Choat et al., 2004). Recently, a previous study proposed that calcium controls vulnerability to cavitation through the stretching properties of the pit membrane (Herbette and Cochard, 2010). In support of this, intermolecular links of pectin chains through calcium bridges are known to influence cell wall rigidity (Ezaki et al., 2005; Proseus and Boyer, 2006; Derbyshire et al., 2007). Thus, we assume that the PME over-expression can increase the pit membrane rigidity through more calcium-dependent links between pectin chains and thus decrease the vulnerability to cavitation.

It has been hypothesized that a lower vulnerability to cavitation should be associated with a lower hydraulic conductivity (Zimmermann 1983; Sperry and Hacke, 2004). This

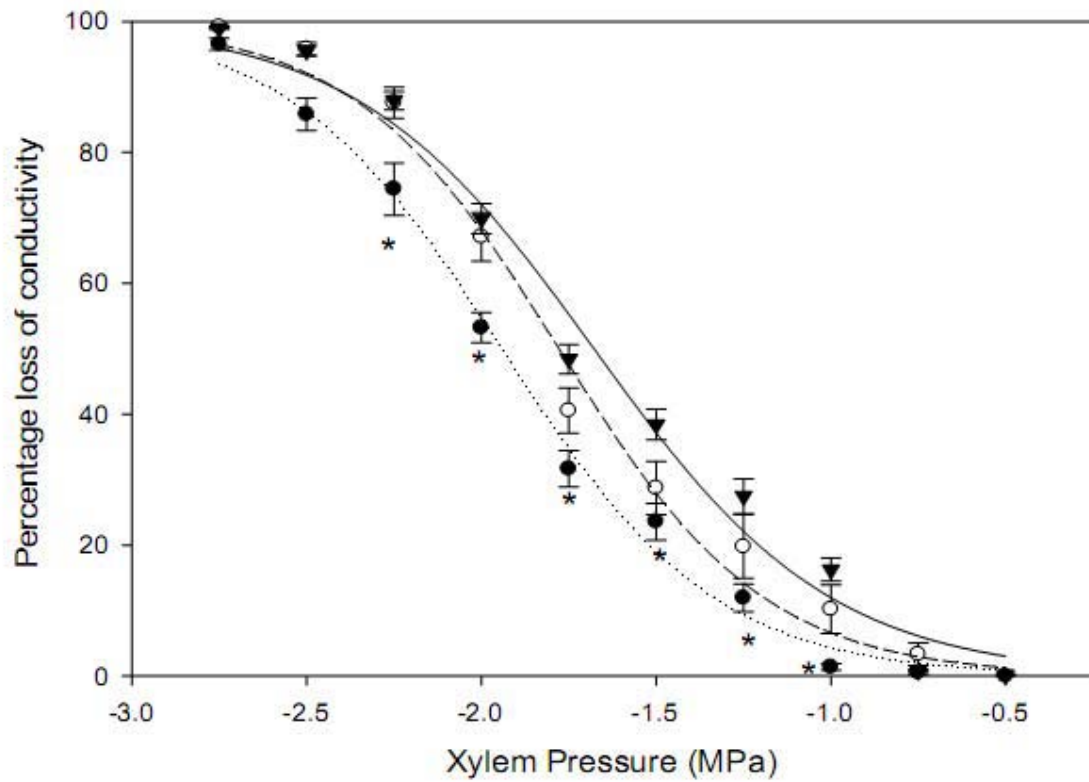


Fig. 3: Xylem vulnerability curves of stems from the PME poplars lines. The percentage loss of xylem hydraulic conductance with decreasing xylem water potential is represented for T89 plants (closed triangles), 2Bs plants (closed circles) and 7s plants (open circles). Each data represents the mean (SE) of 6 to 10 samples. Full lines represent the fitted data according to Eqn (2) (see section on Materials and methods). Data that are significantly different from the control lines (T89) are indicated with an asterisk () for each pressure level.

tradeoff between xylem efficiency and safety was proposed to be linked to pit membrane porosity (Choat and Pittermann, 2009). Some studies bring evidence that the two parameters are largely uncoupled. Removing calcium from the wall increased xylem vulnerability to cavitation but had no effect on xylem hydraulic conductance (Herbette and Cochard, 2010). More, increases in sap ionic concentration induced changes in hydraulic conductivity while it had no effect on vulnerability to cavitation (Cochard et al., 2010). Here, the line 2Bs had the higher specific conductivity while it was less vulnerable to cavitation. This is contradictory to the classic trade-off between conductivity and vulnerability to cavitation and thus it supports the uncoupling found in the other studies.

This study showed that the up-regulated PME line were more resistance to cavitation. The next step will be to carry out analyses of the pit structure and composition on these transgenic plants in order to understand which changes of xylem vessels and pit membranes could affect the vulnerability to cavitation. Despite the great chemical and structural complexity of pectins and other wall components, our results bring evidence that the use of transgenic plants already produced or to be produced, offers a great opportunity to investigate the molecular and genetic bases of the vulnerability to cavitation. This approach has to be coupled with the recent development of antibodies directed against different polysaccharides features (Liners et al., 1989).

References

- Awad H, Barigah T, Badel E, Cocharda H and Herbette S (2010) Poplar vulnerability to xylem cavitation acclimates to drier soil conditions. *Physiologia Plantarum*. ISSN 0031-9317.
- Bosch M and Hepler PK (2005) Pectin methylesterases and pectin dynamics in pollen tubes. *Plant Cell*, 17, 3219–3226.
- Bosch M, Cheung AY and Hepler PK (2005) Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth. *Plant Physiol* 138: 1334-1346.
- Choat B and Pittermann J (2009) New insights into bordered pit structure and cavitation resistance in angiosperms and conifers. *New Phytol* 182: 557–560.
- Choat B, Ball M, Luly J and Holtum J (2003) Pit membrane porosity and water stress-induced cavitation in four co-existing dry rain forest trees species. *Plant Physiol* 131: 41-44.
- Choat B, Jansen S, Zwieniecki MA, Smets E and Holbrook NM (2004) Changes in pit membrane porosity due to deflection and stretching: the role of vested pits. *J.EXP.Bot* 25: 815-819.
- Cochard H (2002) A technique for measuring xylem hydraulic conductance under high negative pressures. *Plant Cell Environ* 25: 815–819.
- Cochard H (2006) Cavitation in trees. *C R Phys* 7:1018–1026.
- Cochard H, Gaelle D, Bodet C, Tharwat I, Poirier M and Améglio T (2005) Evaluation of a new centrifuge technique for rapid generation of xylem vulnerability curves. *Physiol Plant* 124: 410–418.
- Cochard H, Herbette S, Hernandez E, Holttä T and Mencuccini M (2010) The effects of sap ionic composition on xylem vulnerability to cavitation. *JExpBot* 61: 275–285.
- Crombie DS, Hipkins MF and Milburn JA (1985) Gas penetration of pit membranes in the xylem of *Rhododendron* as the cause of acoustically detected sap cavitation. *Aust J Plant Physiol* 12: 445–453.
- Cruiziat P, Cochard H and Améglio T (2002) Hydraulic architecture of trees: main concepts and results. *Ann For. Sci* 59: 723–752.
- Derbyshire P, McCann MC and Roberts K (2007) Restricted cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. *BMC Plant Biol* 7: 31.
- Dickson WC (2000) *Integrative Plant Anatomy*. Academic Press, San Diego.
- Domec JC and Gartner BL (2001) Cavitation and water storage capacity in bole xylem segments of mature and young Douglas-fir trees. *Trees Struct Funct* 15: 204–214.

Ezaki N, Kido N, Takahashi K and Katou K (2005) The role of wall Ca^{2+} in the regulation of wall extensibility during the acid-induced extension of soybean hypocotyl cell walls. *Plant Cell Physiol* 46: 1831–1838.

Fromm J, Rockel B, Lautner S, Windeisen E and Wanner G (2003) Lignin distribution wood cell walls determined by TEM and backscattered SEM techniques. *Journal of Structural Biology* 143: 77–84.

Gasco A, Nardini A, Gortan E and Salleo S (2006) Ion-mediated increase in the hydraulic conductivity of Laurel stems: role of pits and consequences for the impact of cavitation on water transport. *Plant Cell Environ.* 29:1946–1955.

Goldberg R., Morvan C, Jauneau A, and Jarvis MC (1996). Methyl-esterification, deesterification and gelation of pectins in the primary cell wall. In *Pectins and Pectinases*, J. Visser and A.G.J. Voragen, eds (Amsterdam: Elsevier Science), pp. 151–172.

Hacke UG, Stiller V, Sperry JS, Pittermann J and McCulloh KA (2001) Cavitation fatigue: embolism and refilling cycles can weaken the cavitation resistance of xylem. *Plant Physiol* 125: 779–786.

Hargrave KR, Kolb KJ, Ewers FW and Davis SD (1994) Conduit diameter and drought-induced embolism in *Salvia mellifera* Greene (Labiatae). *New Phytologist* 126: 695–705.

Hasunuma T, Fukusaki E and Kobayashi A (2004) Expression of fungal pectin methylesterase in transgenic tobacco leads to alteration in cell wall metabolism and a dwarf phenotype *J Biotechnol* 111: 241–251.

Herbette S and Cochard H (2010) Calcium Is a Major Determinant of Xylem Vulnerability to Cavitation. *Plant Physiology* 153: 1–8.

Jansen S, Choat B and Pletsers A (2009) Morphological variation of intervessel pit membranes and implications to xylem function in angiosperms. *American Journal of Botany* 96: 409–419.

Lens F, Endress ME, Baas P, Jansen S and Smets E (2009) Vessel grouping patterns in subfamilies Apocynoideae and Periplocoideae confirm phylogenetic value of wood structure within Apocynaceae. *American Journal of Botany* 96: 2168–2183.

Lens F, Gasson P, Smets E and Jansen S (2003) Comparative wood anatomy of epacrids (Styphelioideae, Ericaceae s.l.). *Annals of Botany* 91: 835–856.

Lens F, Luteyn JL, Smets E and Jansen S (2004) Ecological trends in the wood anatomy of Vaccinioideae (Ericaceae s.l.). *Flora* 199: 309–319.

Liners F, Letesson J-J, Didembourg C and Van Cutsem P (1989) Monoclonal antibodies against pectin: Recognition of a conformation induced by calcium. *Plant Physiol.* 91:1419–1424.

López-Portillo, J., Ewers F and Angeles G (2005) Sap salinity effects on xylem conductivity in two mangrove species. *Plant Cell Environ.* 28:1285–1292.

Milburn JA (1993) Cavitation. A review: past, present and future. In M Borghetti, J Grace, A Raschi, eds, *Water Transport in Plants under Climatic Stress*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 14–26.

Mohnen D (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 266–277.

Morizet J and Mingeau M (1976) Effect of environment on water-uptake, as studied on beheaded exuding tomato.1. Role of nutrients. *Ann Agron* 27: 183–205.

Moustakas AM, Nari J, Borel M, Noat G and Ricard J (1991) Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. The role of metal ions in plant cell-wall extension. *Biochem. J.* 279, 351–354.

Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473–492.

Oertli JJ (1971) The stability of water under tension in the xylem. *Z Pflanz-physiol* 65: 195–209.

Pammenter NW and Van Der Willigen C (1998) A mathematical and statistical analysis of the curves illustrating vulnerability of xylem to cavitation. *Tree Physiology* 18: 589–593.

Parre E and Geitmann A (2005) Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*. *Planta*, 220, 582–592.

Pelloux J, Rusterucci C and Mellerowicz EJ (2007) New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci* 12: 267–277.

Pickard WF (1981) The ascent of sap in plants. *Prog Biophys Mol Biol* 37: 181–229.

Pilling J, Willmitzer L and Fisahn J (2000) Expression of a *Petunia inflata* pectin methyl esterase in *Solanum tuberosum* L-enhances stem elongation and modifies cation distribution. *Planta* 210: 391–399.

Pilling J, Willmitzer L, Bücking H and Fisahn J (2004) Inhibition of a ubiquitously expressed pectin methyl esterase in *Solanum tuberosum* L. affects plant growth, leaf growth polarity, and ion partitioning. *Planta* 219: 32–40.

Proseus TE and Boyer JS (2006) Calcium pectate chemistry controls growth rate of *Chara corallina*. *J Exp Bot* 57: 3989–4002.

Ridley BL, O'Neill MA and Mohnen D (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*. 57, 929–967.

Scholander P, Hammel H, Bradstreet E and Hemmingsen E (1965) Sap pressure in vascular plants. *Science* 148: 339–346.

Shackel K, Ahmadi H, Biasi W, Buchner W, Goldhamer D, Gurusinghe S, Hasey J, Kester D, Krueger B, Lampinen B, McGourty G, Micke W, Mitcham E, Olson B, Pelletreau K, Philips H, Ramos D, Shwankl L, Sibbett S, Snyder R, Southwick S, Stevenson M, Thorpe M,

Weinbaum S and Yeager J (1997) Plant water status as an index of irrigation need in deciduous fruit trees. *Hortic Technol* 7: 23–29.

Siedlecka A, et al. (2008). Pectin methyl esterase inhibits intrusive and symplastic cell growth in developing wood cells of *Populus*. *Plant Physiol.* 146, 554–565.

Sparks JP and Black A (1999) Regulation of water loss in populations of *Populus trichocarpa*: the role of stomatal control in preventing xylem cavitation. *Tree Physiol* 19: 453–459.

Sperry JS and Hacke UG (2004) Analysis of circular bordered pit function I. Angiosperm vessels with homogenous pit membranes. *American Journal of Botany* 91: 369–385.

Sperry JS and Tyree MT (1988) Mechanism of water-stress induced embolism. *Plant Physiol* 88: 581–587.

Sperry JS, Donnelly JR and Tyree MT (1988) A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant Cell Environ* 11: 35–40.

Sperry JS, Hacke UG and Pittermann J (2006) Size and function in conifer tracheids and angiosperm vessels. *Am J Bot* 93: 1490–1500.

Stachelin LA and Moore I (1995) The plant Golgi apparatus: structure, functional organization and trafficking mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 261–288.

Sterling JD, Quigley HF Orellana A and Mohnen D (2001) The catalytic site of the pectin biosynthetic enzyme α -1,4- galacturonosyltransferase is located in the lumen of the Golgi. *Plant Physiol.* 127, 360–371.

Tieman DM, Harriman RW, Ramamohan G and Handa AK (1992) An antisense pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruit. *Plant Cell* 4: 667–679.

Tyree MT and Sperry JS (1988) Do woody plant operate near the point of catastrophic xylem dysfunction caused by dynamic water stress? *Plant Physiol* 88: 574–580.

Tyree MT and Sperry JS (1989) Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 40: 19–38.

Van Ieperen W, Van Meeteren U and Van Gelder H (2000) Fluid ionic composition influences hydraulic conductance of xylem conduits. *J. Exp. Bot* 51:769–776.

Vincken J-P, Schols HA, Oomen RJFJ, McCann MC, Ulvskov P, Voragen AGJ, Visser RGF (2003) If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology* 132: 1781–1789.

Wen F, Zhu Y and Hawes MC (1999) Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development. *Plant Cell* 11: 1129–1140.

Wheeler JK, Sperry JS, Hacke UG and Hoang N (2005) Intervessel pitting and cavitation in woody Rosaceae and other vesselled plants: a basis for a safety versus efficiency trade-off in xylem transport. *Plant Cell Environ.* 28: 800–812;

Willats WG, McCartney L, Mackie W and Knox JP (2001) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol. Biol.* 47, 9–27.

Zhang, GF and Staehelin LA (1992) Functional compartmentation of the golgi apparatus of plant cells: immunocytochemical analysis of high-pressure frozen- and freeze-substituted sycamore maple suspension culture cells. *Plant Physiol.* 99, 1070–1083.

Zimmermann MH, ed (1983) Xylem structure and the ascent of sap. Springer Verlag, Berlin.

Zwieniecki MA, Melcher PJ and Holbrook NM (2001) Hydrogel control of xylem hydraulic resistance in plants. *Science* 291:1059–1062.

Discussion générale et perspectives

Dans un premier volet de cette thèse, nous avons analysé la vulnérabilité à la cavitation de peupliers soumis à des régimes hydriques différents. Dans un second volet, nous avons recherché les bases génétiques et structurales de la vulnérabilité à la cavitation du xylème. Les travaux menés dans ces 2 volets nous ont donné l'opportunité d'étudier la relation entre les propriétés hydrauliques, structurales et mécaniques du bois. Ces 3 axes seront discutés dans 3 parties successives.

I. Acclimatation de la vulnérabilité à la cavitation à la disponibilité en eau.

Les espèces ligneuses étant longévives, la plasticité phénotypique joue un rôle fondamental dans la capacité d'acclimatation des individus à l'environnement (Ackerly et al., 2000 ; Valladares et al., 2007). L'effet de la lumière est probablement le mieux documenté, avec les branches de lumière qui sont moins vulnérables à la cavitation que les branches d'ombre (Cochard et al., 1999 ; Barigah et al., 2006). La vulnérabilité à la cavitation du xylème s'acclimate également à la disponibilité des nutriments du sol (Harvey et Van Den Driessche, 1999). Cependant, la capacité de s'acclimater à la disponibilité en eau reste à démontrer bien qu'elle ait déjà été explorée, notamment chez des espèces résistantes à la sécheresse (Beikircher et Mayr, 2009; Ladjal et al., 2005). Le lien entre ces facteurs environnementaux et la vulnérabilité à la cavitation n'est pas évident et les explications restent hypothétiques. La vulnérabilité à la cavitation étant considérée comme un paramètre de tolérance à la sécheresse, plusieurs études relatent une corrélation entre la disponibilité en eau et la vulnérabilité à la cavitation de différentes populations *in situ* (Maherali et De Lucia 2000; Choat et al., 2007). Cependant, ces études *in situ* ne permettent pas de distinguer les effets des multiples facteurs environnementaux, et une fois de plus, l'effet de la disponibilité en eau sur la vulnérabilité à la cavitation reste hypothétique. Nous avons aussi montré que des populations *in situ* de hêtres sur des sites contrastés pour leur climat présentaient des différences pour leur vulnérabilité à la cavitation (Annexe, Herbette et al., 2010). Cependant, contrairement à ce que nous attendions, les populations les plus vulnérables à la cavitation sont celles se développant sur les sites les plus secs. Une étude s'imposait donc pour tester l'effet de la disponibilité en eau sur la vulnérabilité à la cavitation. Contrairement aux études réalisées *in situ* (Maherali et De Lucia 2000; Choat et al., 2007 ; Herbette et al., 2010), l'utilisation d'un clone de peuplier cultivé en condition contrôlée dans notre étude a permis de s'affranchir sans équivoque des effets génétiques et des autres effets environnementaux. Nos travaux démontrent qu'une sécheresse modérée pendant la phase de croissance entraîne une acclimatation de la vulnérabilité à la cavitation, ainsi que des propriétés structurales du

xylème (chapitre 1) : les arbres cultivés sous des conditions hydriques plus sèches développent un xylème moins vulnérable à la cavitation. Nos résultats suggèrent que la plasticité phénotypique, représente une grande partie de la variabilité phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation.

L'acclimatation de la vulnérabilité à la cavitation à la teneur en eau du sol supporte l'hypothèse que la résistance de cavitation est un trait de résistance à la sécheresse pour les arbres. La valeur de P_{12} , pression du xylème pour laquelle la cavitation commence, est corrélée avec la plus faible valeur du potentiel hydrique foliaire (ψ_m) subie par chaque plante ; la différence entre les deux paramètres étant une constante d'environ 0,5 MPa, considérée comme une marge de sécurité. Cette marge de sécurité explique le faible taux d'embolie dans les différents traitements hydriques. En d'autres termes, les peupliers ont développé un xylème pour limiter l'embolie du xylème.

D'un point de vue finalisé, notre étude démontre qu'il est possible d'ajuster l'approvisionnement en eau sans trop perturber la croissance pour améliorer la résistance de cavitation.

L'acclimatation pouvant jouer un rôle clef dans le contexte des changements climatique, il est nécessaire d'identifier les facteurs qui modulent la plasticité phénotypique de ce caractère de résistance à la sécheresse pour aider les forestiers et gestionnaires dans les prises de décisions sur les modes de gestion des peuplements. Plusieurs expérimentations s'avèrent nécessaires pour identifier ces facteurs de la plasticité phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation. La vulnérabilité à la cavitation est un caractère qui dépend de la structure du xylème et qui ne varie pas ou très peu avec les variations environnementales saisonnières (Herbette et al., 2010). Et, nous avons montré que la vulnérabilité à la cavitation est très dépendante des valeurs minimales de potentiel hydrique du xylème au cours de la croissance de la plante (chapitre 1). Ainsi, dans les recherches à mener sur les facteurs contrôlant la vulnérabilité à la cavitation, il faudra considérer les conditions hydriques qui règnent pendant la formation du xylème. Parce que la période et la vitesse de formation du xylème sont très différentes selon les espèces, notamment entre les espèces pionnières et les post- pionnières ou climaciques dont la croissance est généralement plus lente et/ou plus restreinte dans le temps.

Grâce à ce dispositif expérimental en conditions contrôlées permettant d'avoir de grandes différences de la vulnérabilité à la cavitation chez des peupliers génétiquement identiques et de même âge, nous avons pu envisager une recherche des bases génétiques et structurales de la vulnérabilité à la cavitation.

II. Bases génétiques et structurales de la vulnérabilité à la cavitation.

II.1 Bases génétiques de la vulnérabilité à la cavitation

La recherche des gènes clefs de la vulnérabilité à la cavitation comporte plusieurs niveaux de difficulté et de complexité. C'est, sans doute, une raison expliquant l'absence d'étude sur ce sujet lorsque la thèse a commencé. L'ensemble de ces difficultés d'étude nous conduit à choisir une approche de type « gènes candidats » avec deux approches différentes : 1) L'identification de gènes candidats par des études d'expression et 2) La validation de gènes candidats dans des plantes transgéniques.

Pour les études d'expression, les gènes candidats impliqués dans la paroi primaire ont été choisis à partir de l'étude de Hertzberg et al. (2001), dans laquelle le transcriptome de la formation du xylème a été caractérisé chez le peuplier (*Populus tremula* x *Populus tremuloides*). Dans cette étude, le niveau de transcrits de 2995 gènes a été analysé dans 5 zones du bois : les cellules méristématiques, les cellules en début d'expansion, les cellules en fin d'expansion, les cellules avec formation de la paroi secondaire et les cellules en maturation tardive. Les gènes ont été sélectionnés sur la base de deux considérations : 1) ces gènes doivent être spécifiquement impliqués dans le métabolisme de la paroi primaire, soit celui des pectines et des hémicelluloses. 2) ces gènes doivent avoir une expression accrue dans le xylème en formation. Dix gènes ont été choisis dans cette étude : 2 pectines méthylesterases (PME1 et PME2), 2 polygalacturonases (PG1 et PG2), 3 UDPGlucose deshydrogenase (UGDH1, UGDH2 et UGDH3) et 2 xylan 1,4- β -xylosidase (XYL1 et XYL2) et un gène impliqué dans le métabolisme de la paroi secondaire codant pour une acide caffeique 3-O- méthyltransferase (COMT).

Les expressions de ces 10 gènes du métabolisme pariétal ont été analysées sur le xylème et sur l'écorce de peupliers soumis à 3 régimes hydriques différents et dans 2 états hydriques (avant et après arrosage). A partir de l'analyse d'expression des gènes candidats par qPCR, nous n'avons pas obtenu les résultats escomptés. Bien que certains des gènes choisis montrent des différences d'expression selon le régime hydrique (chapitre 1) ou encore dans les plantes transgéniques dont le gène OMT est réprimé (chapitre 2), il est difficile d'établir un lien entre ces expressions géniques et la vulnérabilité à la cavitation. En effet, les différences d'expression entre les traitements hydriques sont comparables dans les 2 parties de la tige analysées : le xylème et l'écorce ; elles ne sont donc pas ni spécifique du xylème, ni du métabolisme des ponctuations entre vaisseaux. Par conséquent, chez les lignées transgéniques OMT2b et OMT10b plus vulnérables à la cavitation, les répressions des gènes impliquées

dans le métabolisme des pectines et des hémicelluloses ne peuvent être liées au métabolisme des punctuations. Cette répression de l'ensemble des gènes du métabolisme pariétal, y compris le gène OMT impliqué dans le métabolisme des lignines, résulterait davantage d'une régulation coordonnée des gènes du métabolisme pariétal. Nous en concluons que l'identification des gènes candidats par des études d'expression n'est pas le choix pertinent pour rechercher les bases génétiques de la vulnérabilité à la cavitation.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons eu recours à plusieurs lignées transgéniques déjà produites. Le recours à ce matériel végétal déjà produit a été l'opportunité de tester plusieurs lignées transgéniques, tout en prenant des risques modérés dans nos hypothèses. Au contraire des résultats de qPCR, l'approche basée sur des plantes transgéniques s'est avérée plus fructueuse. Ainsi, nous avons pu observer des différences de vulnérabilité à la cavitation chez des peupliers transgéniques présentant des modifications dans la composition des lignines, et chez d'autres peupliers surexprimant une pectine méthylestérases (PME).

Nous avons utilisé plusieurs lignées de peupliers transgéniques avec des modifications dans la composition de la lignine pour étudier les bases génétiques de la vulnérabilité à la cavitation. Chez certaines de ces lignées produites par le laboratoire (INRA, UR 0588 AGPF Orléans) du Dr. Gilles Pilate, une mort du bourgeon apical survenait après quelques semaines, laissant supposer une perte de conductance hydraulique. Par ailleurs, une étude publiée au cours de la thèse a suggéré un rôle de la lignine dans la vulnérabilité à la cavitation du xylème (Colemann et al., 2008). Dans cette étude, une diminution de la teneur en lignine du xylème chez les peupliers transgéniques réprimés pour l'expression de la Coumaroyl 3'-hydroxylase (C3'H) conduit à une augmentation de la vulnérabilité à la cavitation. Plus récemment, d'autres peupliers transgéniques réprimé pour l'expression de la 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL), avec de fortes réductions des teneurs en lignine du xylème, ont une efficacité réduite dans le transport de l'eau (Kitin et al., 2010). Ces études récentes montrent un intérêt nouveau des recherches des bases génétiques de la vulnérabilité à la cavitation. Cependant, la forte réduction en teneur de lignines chez ces lignées conduit au collapse du xylème (Coleman et al., 2008 ; Kitin et al., 2010). Ainsi, leur xylème serait plutôt vulnérable au collapse qu'à la cavitation. Dans ce cas, la vulnérabilité à la cavitation s'expliquerait davantage par une fragilisation de la structure des punctuations lors du collapse. Une autre explication serait que la perte de conductance mesurée en fonction de la pression du xylème serait plus la conséquence du collapse que d'un phénomène de cavitation. Les différentes lignées que nous avons analysées présentent davantage une modification de la composition en lignines que de leur teneur, et elles présentent des modifications assez mineures de la structure du xylème

(van Doorselaere et al., 1995, Baucher et al., 1996 ; Lapierre et al., 1999 ; Pilate et al., 2002). Parmi ces différentes lignées testées, les lignées ASOMT10b et ASOMT2b présentaient une augmentation de la vulnérabilité à la cavitation par rapport à la lignée non transformée. Nous n'avons pas observé de collapse pour ces lignées, permettant d'exclure tout biais dans la mesure de la vulnérabilité à la cavitation. Nous apportons donc la preuve que les lignines sont impliquées dans la vulnérabilité à la cavitation, probablement par des modifications des parois de la ponctuation.

Nous avons aussi analysé 2 lignées de peupliers transgéniques surexprimant l'activité d'une pectine méthylestérases (PME) spécifique du xylème (Siedlecka et al., 2007). La lignée 2Bs a été trouvée significativement plus résistante à la cavitation que la lignée témoin (T89), tandis que cette différence est plus faible et non significative avec la lignée 7s (chapitre 3). Ces résultats sont cohérents avec les degrés de méthylation (DM) des homogalacturonanes : la ligne 2Bs présente un DM plus faible que la lignée 7s et plus faible encore que le témoin T89 (Siedlecka et al., 2008).

Les différences observées chez les différentes lignées transgéniques peuvent s'expliquer par deux hypothèses au niveau des ponctuations : 1) la structure et composition de la paroi des ponctuations et 2) l'aire des ponctuations.

La première hypothèse concerne la structure et la composition de la paroi de la ponctuation. Les lignines ont été détectés dans la paroi de la ponctuation du xylème de hêtre (Fromm et al., 2003). Ceci n'est pas surprenant lorsque la lamelle moyenne dans les tissus du xylème contient beaucoup de lignines (plus de 60%), ainsi que la paroi primaire dans une moindre mesure (Navi and Heger, 2005). Aussi, il y a une preuve expérimentale du rôle des propriétés mécaniques de la paroi de la ponctuation dans le processus de cavitation (Choat et al., 2004; Sperry and Hacke, 2004). Ainsi, il est très plausible qu'une modification dans la composition des lignines pourrait légèrement affecter le comportement mécanique de la paroi des ponctuations des lignées ASOMT2b et ASOMT10b.

Selon les résultats de qPCR (chapitre 2), la sous-expression des gènes COMT dans ces peupliers transgéniques s'accompagne d'une sous-expression de nombreux autres gènes impliqués dans le métabolisme de la paroi primaire : deux pectine méthylestérases (PME), deux polygalacturonases (PG), trois UDP-glucose déshydrogénases (UGDH) et deux xylane synthases (XYL). Chacune de ces isoformes, a été trouvée spécifiquement exprimée au cours de la xylogénèse (Hertzberg et al., 2001). Nous pouvons donc supposer que, la sous-expression des composants de la paroi primaire pourrait résulter en une paroi de la ponctuation plus fine et plus vulnérable à la cavitation.

Les PME sont susceptibles d'intervenir sur différentes propriétés de la paroi de la ponctuation : l'épaisseur, la porosité et l'étirement. La cavitation est supposée se produire, quand une bulle d'air traverse un pore de la ponctuation ; elle serait donc fortement influencée par la porosité de la paroi (Tyree et Sperry, 1988; Cochard, 2006). Les observations anatomiques indiquent que la porosité est d'autant plus faible que la paroi est épaisse (Jansen et al., 2009). Or, les PME en agissant sur l'interaction entre le calcium et les pectines sont connues pour agir sur la porosité ou épaisseur de la paroi (Bosch et al., 2005; Vincken et al., 2003). D'autres études utilisant des plantes transgéniques modifiées pour l'expression de PME, indiquent que ces gènes jouent un rôle dans la rigidification de la paroi et dans l'inhibition de la plasticité de la paroi (Wen et al., 1999; Hasunuma et al., 2004; Bosch et al., 2005). Récemment, une étude a proposé que le calcium contrôle la vulnérabilité à la cavitation, grâce aux propriétés d'étirement de la paroi de la ponctuation (Herbette et Cochard, 2010). En effet, les ponts de calcium entre des chaînes pectiques sont connus pour influencer la rigidité de la paroi cellulaire (Ezaki et al., 2005; Proseus et Boyer, 2006; Derbyshire et al., 2007). Ainsi, nous supposons que la surexpression de la PME chez les peupliers puisse augmenter la rigidité de la paroi de la ponctuation et donc de réduire la vulnérabilité à la cavitation.

La deuxième hypothèse repose sur l'hypothèse de la " ponctuation rare " selon laquelle le processus de cavitation est d'autant plus probable (et donc le vaisseau vulnérable) que l'aire occupée par des ponctuations est grande. Dans le cadre de cette hypothèse, les lignées ASOMT10b et ASOMT2b auraient des vaisseaux plus longs et/ou des plus grandes ponctuations, puisque le diamètre moyen des vaisseaux est resté inchangé dans les lignées de peupliers transgéniques (chapitre 2). Cela aurait pour conséquence une augmentation de l'aire des ponctuations, ce qui conduirait à des arbres plus vulnérables à la cavitation.

L'aire totale des ponctuations a été corrélée au diamètre des vaisseaux (Lens et al., 2003, 2004, 2009; Sperry et al., 2006), et les PME sont bien connues pour réguler la croissance cellulaire (Bosch et Hepler, 2005; Bosch et al., 2005; Parre et Geitmann, 2005). Ainsi, les PME pourraient contrôler l'aire totale des ponctuations par le contrôle du diamètre du vaisseau. Toutefois, Siedlecka et al. (2008) avaient démontré qu'il n'y a pas de différences significatives entre les lignées T89, 2B et 7s pour la longueur et le diamètre du vaisseau. Bien que nous ne pouvons pas exclure cette hypothèse de la « ponctuation rare », il apparaît peu probable que la surexpression d'une PME puisse affecter l'aire totale des ponctuations.

Des analyses supplémentaires de la composition biochimique des ponctuations et du xylème de ces plantes transgéniques sont nécessaires, pour clarifier le rôle des lignines et des

pectines, et des gènes OMT et PME dans le contrôle de la vulnérabilité à la cavitation. Il serait notamment intéressant de réaliser une analyse de la composition de leurs ponctuations grâce à des anticorps reconnaissant des caractéristiques structurales de polysaccharides. A l'heure actuelle, les techniques d'immuno-histochimie sont les meilleurs moyens de discerner les aspects microstructuraux de la paroi cellulaire et de localiser précisément les polymères *in situ* dans un tissu complexe. Un panel d'anticorps monoclonaux a été mis au point contre des motifs de pectines, de xyloglucanes (Marcus et al., 2008), de xylanes (Guillon et al., 2008) et de mannanes (Handford et al., 2003). L'idée serait donc de les exploiter pour caractériser les ponctuations des peupliers transgéniques modifiés pour leur vulnérabilité à la cavitation.

II.2 Bases structurales de la vulnérabilité à la cavitation.

Les premières études sur les ponctuations ont souligné les différences entre l'ultrastructure des ponctuations de différentes espèces, et elles ont indiqué le peu de variation entre les ponctuations au sein d'une espèce (Schmid, 1965; Schmid et Machado, 1968; Yang, 1978). Jansen et al. (2009) ont utilisé la microscopie électronique à balayage et la microscopie électronique à transmission, pour examiner les variations structurales des ponctuations dans 26 espèces de feuillus. Choat et al. (2003) ont révélé une faible corrélation entre la porosité de la ponctuation et la vulnérabilité à la cavitation avec les techniques d'observation employées. Les différences sont telles entre espèces qu'il est difficile de mettre en évidence des corrélations entre les propriétés de ces ponctuations et la vulnérabilité à la cavitation. Mais jusqu'à présent, il n'existe pas d'études sur la variabilité de la paroi de la ponctuation et sur la corrélation entre la ponctuation et la vulnérabilité à la cavitation au niveau intra-spécifique. Nous avons donc utilisé la technique de la microscopie électronique à transmission (MET) pour comparer la paroi de la ponctuation entre des peupliers de même génotype et cultivés sous 2 traitements hydriques différents. En effet, nous avons observé des différences significatives de vulnérabilité à la cavitation entre des peupliers soumis à des régimes hydriques contraignants (chapitre 1), et il nous a donc paru pertinent de s'intéresser aux bases structurales de cette plasticité de la vulnérabilité à la cavitation. Cette étude présente aussi l'avantage de se faire dans des conditions contrôlées qui limitent les facteurs de variations des propriétés du xylème. L'analyse au TEM nous a permis de réaliser trois mesures sur les ponctuations : le diamètre de l'ouverture, le diamètre de la paroi et l'épaisseur de la paroi. Pour le diamètre de l'ouverture de la ponctuation il n'y pas de différences entre les plantes des 2 traitements hydriques (SS et témoins, chapitre 1). Pour le diamètre de la paroi de la ponctuation, nous avons trouvé des différences entre les plantes des 2 traitements hydriques.

Pour la mesure de l'épaisseur de la paroi de ponctuation, nous avons été confrontés à deux difficultés : 1) les variations locales étaient trop importantes et le peuplier présente une paroi trop fine qui ne permet pas d'envisager ce type de mesure, 2) les échantillons étaient déjà trop déshydratés lorsque nous avons entrepris cette mesure (plusieurs semaines après la récolte), et la paroi n'était peut être pas en bon état pour effectuer cette mesure.

Les plants SS, plus résistants à la cavitation, ont le plus court diamètre de la paroi de la ponctuation, alors que les plantes témoins, moins résistant à la cavitation ont le plus long diamètre de paroi de la ponctuation. La plus forte résistance des plants SS peut trouver deux explications non exclusives l'un de l'autre :

- 1) Une réduction du diamètre de la paroi et donc de la surface réduirait la probabilité d'avoir un pore laissant passer l'air à une pression donnée.
- 2) Lorsqu'il y a une différence de pression entre le vaisseau rempli de sève et celui rempli d'air, la paroi se trouve étirée. Cet étirement est d'autant plus faible que le diamètre de la paroi est petit. Ainsi, les pores dans la paroi sont moins élargis et leur vulnérabilité au passage d'air est plus faible.

Plavcova et al (2011) ont étudié l'effet de l'ombrage sur les propriétés hydrauliques et anatomiques du xylème chez un autre peuplier hybride (*Populus trichocarpa* x *deltoides*, clone H11-11). Ils ont trouvé des différences dans la résistance à la cavitation et dans l'épaisseur de la paroi de la ponctuation. Ces résultats et les nôtres montrent que la plasticité de la vulnérabilité à la cavitation est liée à des modifications structurales au niveau des ponctuations.

Des analyses supplémentaires de la structure des ponctuations sont toutefois nécessaires. Nous avons utilisé la technique de la microscopie électronique à transmission (MET), mais il faut développer de nouvelles techniques de microscopie pour élucider plus clairement la relation entre ponctuation et propriétés hydrauliques. Il est possible d'observer des ponctuations hydratées et sous étirement, grâce à la technique de microscopie environnementale (ESEM-FEG). Une alternative est d'observer des échantillons congelés dans un Cryo-SEM. Les échantillons seront soumis à des pressions négatives juste en dessous du point d'apparition de la cavitation par déshydratation, et à une congélation instantanée avec de l'azote liquide. Par ailleurs, la microscopie à force atomique (AFM) permet aussi d'analyser des échantillons hydratés et non fixés. L'AFM pourra aussi être utilisée pour caractériser les propriétés viscoélastiques des ponctuations.

III. Relation entre la vulnérabilité à la cavitation et d'autres propriétés du bois.

III.1 Relation entre vulnérabilité à la cavitation et conductance hydraulique

L'hypothèse de compromis entre l'efficacité hydraulique et la résistance à l'embolie du xylème a aussi des répercussions au sein des individus. Puisque le potentiel hydraulique diminue à partir du sol vers les feuilles, il serait raisonnable de s'attendre à un gradient de propriétés hydrauliques dans les plantes. Pour le fonctionnement hydraulique, l'embolie d'une certaine proportion de vaisseaux peut s'avérer être avantageux. L'embolie du xylème peut être considérée comme un mécanisme de contrôle, qui, dans le cadre de l'activité des stomates, régule la quantité d'eau extraite par les plantes (Salleo et al., 2000). Sous certaines conditions, une baisse de la conductivité du xylème liée à une embolie partielle peut permettre aux plantes de limiter les pertes d'eau (Sperry, 2000).

La conductance hydraulique et la vulnérabilité à la cavitation dépendent tous deux des ponctuations reliant les vaisseaux entre eux. On estime que les ponctuations seraient responsables de la moitié de la résistance hydraulique, l'autre moitié dépendant de la lumière des vaisseaux. Ainsi, la résistance à la cavitation a été supposée être accompagnée par la faible conductivité hydraulique des pores, et donc de la conductivité hydraulique de la tige (Sperry et Hacke, 2004 ; Zimmermann, 1983). Cette idée classique de compromis entre l'efficacité hydraulique et la sûreté hydraulique est largement basée sur des comparaisons interspécifiques (Martínez-Vilalta et al., 2002 ; Hacke et al., 2006 ; Pratt et al., 2007 ; Hacke et al., 2009 ; Jacobsen et al., 2009). Nos données sur l'acclimatation au régime hydrique ainsi que sur les différentes plantes transgéniques analysées ne confirment pas cette idée. Ainsi, il peut y avoir des variations de la vulnérabilité à la cavitation sans aucun changement dans la conductivité hydraulique spécifique entre les peupliers des différents traitements hydriques et entre les lignées transgéniques modifiées pour les lignines. Cette absence de relation a déjà été observé au niveau intra-spécifique chez les séquoia et le pin sylvestre (Burgess et al., 2006; Martinez-Vilalta et al., 2009). Toutefois, cela est moins surprenant chez les conifères en raison du rôle distinct dans la ponctuation du torus dans la conductivité et de la marge dans la prévention de la cavitation (Cochard 2006). Bien qu'aucune différence n'ait été observée pour la conductivité hydraulique de la tige, le diamètre des vaisseaux, qui représente la conductivité hydraulique des vaisseaux, est en corrélation positive avec la vulnérabilité à la cavitation. Par conséquent, on peut supposer que la conductivité de la paroi de la ponctuation est plus élevée dans les arbres moins vulnérables à la cavitation pour compenser un diamètre réduit. Ceci est en contradiction avec l'hypothèse du compromis entre l'efficacité et sûreté hydraulique, basé sur la paroi de la ponctuation. De façon similaire, la lignée 2B sur-exprimant la PME a une plus grande conductivité spécifique alors qu'elle est moins vulnérable

à la cavitation. Une fois encore, ceci est en contradiction avec le compromis classique entre la conductivité et la vulnérabilité à la cavitation. Les résultats trouvés sur PME ne sont pas si surprenant, car le calcium pourrait influencer différemment les 2 paramètres. En effet, la suppression du calcium de la paroi augmente la vulnérabilité à la cavitation du xylème, mais n'a eu aucun effet sur la conductance hydraulique du xylème (Herbette et Cochard, 2010). Inversement, des modifications de la concentration ionique pouvant influencer la concentration calcique des parois induit des changements dans la conductivité hydraulique sans effet important sur la vulnérabilité à la cavitation (Cochard et al., 2010)

III.2 Relation entre vulnérabilité à la cavitation et propriétés mécaniques

Les 2 principales fonctions du bois, hydraulique et mécanique, seraient plus ou moins reliées entre elles par la densité du bois (Hacke et al., 2001 ; Rosner et al., 2008, 2007; Utsumi et al., 2010). La densité du bois est si souvent corrélée à la vulnérabilité à la cavitation qu'elle a été proposée comme un paramètre accessible pour estimer la vulnérabilité à la cavitation. Par ailleurs, la résistance à la sécheresse est positivement corrélée avec la densité du bois qui est fonction de l'épaisseur de paroi, du diamètre de la lumière et de la fraction du bois final (Hacke et al., 2001; Niklas, 1997). Quant aux propriétés mécaniques, elles dépendent au niveau tissulaire de la porosité du bois, principalement liée la densité du bois, et elles dépendent au niveau cellulaire de l'angle des microfibrilles, de l'agencement des couches de la paroi ou de sa chimie.

Les peupliers cultivés sous des régimes hydriques différents et les lignées transgéniques de lignines présentent des différences dans la vulnérabilité à la cavitation mais n'ont pas de modifications substantielles dans la densité du bois. Nos résultats ne supportent donc pas une corrélation exclusive entre la densité du bois et la résistance à la cavitation. De la même façon, Cochard et al. (2007) n'ont pas trouvé de corrélation chez des clones de peupliers et de saules. Ce manque de corrélation s'explique par le manque de lien déterministe entre la densité du bois et la vulnérabilité à la cavitation qui est basé sur la paroi de la ponctuation.

Chez les lignées transgéniques de lignines nous n'avons observé aucune relation, ni positive ni négative, entre la résistance à la cavitation (P_{50}) et les propriétés mécaniques longitudinal (module d'Young). Par contre, nous avons toujours observé la corrélation positive entre la résistance à l'implosion (évaluée par la mesure $(t/b)^2$) et la vulnérabilité à la cavitation, aussi bien pour les différents traitements hydriques que chez les lignées transgéniques de lignines. Dans les deux cas, les plants les plus résistants à la cavitation ont

les plus hautes valeurs de $(t/b)^2$. Bien que les déterminismes de la vulnérabilité à la cavitation et $(t/b)^2$ sont situés dans des régions différentes de la paroi, les deux traits sont exclusivement liés, car ils dépendent de la pression du xylème.

Les espèces tolérantes à la sécheresse semblent développer une faible vulnérabilité à la cavitation alors que les espèces des milieux humides sont au contraire très vulnérables. Il existerait donc des contraintes fonctionnelles ou compromis à développer un xylème plus résistant à la cavitation. En plus de l'intérêt fondamental de ces compromis, l'utilisation de la vulnérabilité à la cavitation comme critère de sélection pour la tolérance à la sécheresse implique d'identifier ces compromis. Au cours de cette thèse, nous avons montré que le lien entre propriétés hydrauliques et mécaniques n'était pas exclusif. Néanmoins, je suggère de développer des études sur la réponse des plantes à un environnement mécanique fluctuant, pour explorer les relations entre les propriétés hydrauliques et mécaniques du bois. Par ailleurs, comme nous l'avons commencé dans cette thèse, je suggère de tester l'existence de compromis entre la vulnérabilité à la cavitation et d'autres caractères en considérant les bases génétiques de ce compromis, notamment par les approches sur plantes transgéniques.

Pour conclure, les travaux de cette thèse sont les premiers à appréhender les bases moléculaires de la résistance à la cavitation. Nous avons aussi été amenés à développer des études sur la plasticité phénotypique qui montrent une relation forte entre les conditions hydriques du développement et la vulnérabilité à la cavitation. Outre son intérêt fondamental, cette plasticité phénotypique est un très bon modèle d'étude pour analyser les bases moléculaires de la résistance à la cavitation. Par ailleurs, nos travaux démontrent aussi que les plantes transgéniques sont un autre moyen pertinent pour ces recherches. Ces travaux démontrent que les pectines et les lignines ont une fonction dans la résistance à la cavitation.

Références

(A)

- Ackerly DD, Dudley SA, Sultan SE, Schmitt J, Coleman JS, Linder CR, Sandquist DR, Geber MA, Evans AS, Dawson TE, Lechowicz MJ 2000.** The evolution of plant ecophysiological traits: recent advances and future directions. *Bioscience* **50**: 979-995.
- Alder NN, Sperry JS, Pockman WT 1996.** Root and stem xylem embolism, stomatal conductance, and leaf turgor in *Acer grandidentatum* populations along a soil moisture gradient. *Oecologia* **105**: 293–301.
- Alder, NN, WT Pockman, JS Sperry, S Nuismer 1997.** Use of centrifugal force in the study of xylem cavitation. *Journal of Experimental Botany* **48**:665-674.
- Alonso J, Rodriguez MT, Canet W 1996.** Purification and characterization of four pectinesterases from sweet cherry (*Prunus avium* L.). *J. Agric. Food Chem* **44**:3416-3422.
- Améglio T, Bodet C, Lacoïnte A, Cochard H 2002.** Winter embolism, mechanisms of xylem hydraulic conductivity recovery and springtime growth patterns in walnut and peach trees. *Tree Physiology* **22**:1211–1220.

(B)

- Bacic. AH, Stone BA, Clarke AE 1996.** Arabinogalactan proteins: a family of cell-surface and extracellular matrix plant proteoglycans *Essays in Biochemistry* **31**: 91-101.
- Barigah TS, Ibrahim T, Bogard A, Faivre-Vuillin B, Lagneau LA, Montpied P, Dreyer E 2006.** Irradiance-induced plasticity in the hydraulic properties of saplings of different temperate broad-leaved forest tree species. *Tree Physiol* **26**:1505–1516.
- Baucher M, Chabbert B, Pilate G, Van Doorselaere J, Tollier MT, Petit-Conil M, Cornu D, Monties B, Van Montagu M, Inzé D, Jouanin L, Boerjan W 1996.** Red xylem and higher lignin extractability by down-regulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar. *Plant Physiol* **112**: 1479–1490.
- Beikircher B, Mayr S 2009.** Intraspecific differences in drought tolerance and acclimation in hydraulics of *Ligustrum vulgare* and *Viburnum lantana*. *Tree Physiology* **29**: 765–

- Boerjan W, Ralph J, Baucher M 2003.** Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 519–546.
- Bosch M, Cheung AY, Hepler PK 2005.** Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth. *Plant Physiol* **138**: 1334-1346.
- Bosch M, Hepler PK 2005.** Pectin methylesterases and pectin dynamics in pollen tubes. *Plant Cell* **17**: 3219–3226.
- Brett CT 2000.** Cellulose microfibrils in plants: biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. *Int. Rev. Cytol* **199**:161–199.
- Brodribb TJ, Holbrook NM 2005.** Water stress deforms tracheids peripheral to the leaf vein of a tropical conifer. *Plant Physiology* **137**: 1139-1146.
- Brown Jr RM 2004.** Cellulose structure and biosynthesis: what is in store for the 21st century? *Journal of Polymer Science. Part A. Polymer Chemistry* **42**: 487–495.
- Buckeridge MS, Santos HP, Tiné MAS 2000.** Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiol Biochem* **38**: 141–156.
- Burgess SO, Pittermann J, Dawson TE 2006.** Hydraulic efficiency and safety of branch xylem increases with height in *Sequoia sempervirens* (d. don) Endl. crowns. *Plant Cell Environ* **29**: 229–239.

(C)

- Canny M 1995.** A new theory for the ascent of sap: cohesion supported by tissue pressure. *Annals of Botany* **75**: 343–57.
- Canny MJ, McCully ME, Huang CX 2001.** Cryo-scanning electron microscopy observations of vessel content during transpiration in walnut Petioles. Facts or Artefacts? *Plant Physiology and Biochemistry* **39**: 555–563.
- Cardoso SM, Ferreira JA, Mafra I, Silva AM, Coimbra MA 2007.** Structural ripening-related changes of the arabinan-rich pectic polysaccharides from olive pulp cell

- walls, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 7124–7130.
- Chaffey NJ, Barnett JR, Barlow PW 1997.** Visualization of the cytoskeleton within the secondary vascular system of hardwood species. *J Microsc* **187**: 77–84.
- Chaves MM, Maroco JP, JS Pereira 2003.** Understanding plant responses to drought- from genes to the whole plant. *Funct. Plant Biol* **30**: 239-264.
- Choat B, Ball M, Luly J, Holtum J (2003)** Pit membrane porosity and water stress-induced cavitation in four co-existing dry rainforest tree species. *Plant Physiology* **131**: 41– 48.
- Choat B, Brodie TW, Cobb AR, Zwieniecki MA, Holbrook NM 2006.** Direct measurements of intervessel pit membrane hydraulic resistance in two angiosperm tree species. *American Journal of Botany* **93**: 993–1000.
- Choat B, Jansen S, Zwieniecki MA, Smets E, Holbrook NM 2004.** Changes in pit membrane porosity due to deflection and stretching: the role of vestured pits. *J.EXP.Bot* **25**: 815-819.
- Choat B, Pittermann J 2009.** New insights into bordered pit structure and cavitation resistance in angiosperms and conifers. *New Phytol* **182**: 557–560.
- Choat B, Sack L, Holbrook NM 2007.** Diversity of hydraulic traits in nine *Cordia* species growing in tropical forests with contrasting precipitation. *New Phytologist* **175**: 686-698.
- Choat B, Cobb AR, Jansen S 2008.** Structure and function of bordered pits: New discoveries and impacts on whole plant hydraulic function. *New Phytologist* **177**: 608– 626.
- Christensen-Dalsgaard KK, Fournier M, Ennos AR, Barfod AS 2007.** Changes in vessel anatomy in response to mechanical loading in six species of tropical trees. *New Phytologist* **176**: 610-622.
- Christman MA, Sperry JS, Adler FR 2009.** Testing the ‘rare pit’ hypothesis for xylem cavitation resistance in three species of *Acer*. *New Phytologist* **182**: 664–674.
- Cochard H 1992.** Vulnerability of several conifers to air embolism. *Tree Physiology* **11**: 73-

- Cochard H 2002a.** Xylem embolism and drought-induced stomatal closure in maize. *Planta* **215**: 466-471.
- Cochard H 2006.** Cavitation in trees. *C R Phys* **7**:1018–1026.
- Cochard H 2002b.** A technique for measuring xylem hydraulic conductance under high negative pressures. *Plant Cell and Environment* **25**: 815-819.
- Cochard H, Bodet C, Ameglio T, Cruiziat P 2000a.** Cryo-scanning electron microscopy observations of vessel content during transpiration in walnut petioles. Facts or artifacts? *Plant Physiology* **124**: 1191-1202.
- Cochard H, Bréda N, Granier A 1996.** Whole tree hydraulic conductance and water loss regulation in *Quercus* during drought. Evidence for stomatal control of embolism ? *Annales des Sciences Forestières* **53**: 197-206.
- Cochard H, Bréda N, Granier A, Aussenac G 1992a.** Vulnerability to air embolism of three european oak species (*Quercus petraea* (Matt) Liebl, *Q. pubescens* Willd, *Q. robur* L). *Annales des Sciences Forestières* **49**: 225-233.
- Cochard H, Casella E, Mencuccini M 2007.** Xylem vulnerability to cavitation varies among poplar and willow clones and correlates with yield. *Tree Physiol* **27**: 1761–1767.
- Cochard H, Coll L, Le Roux X, Améglio T 2002.** Unraveling the effects of plant hydraulics on stomatal conductance during water stress in walnut. *Plant Physiology* **128**: 282-290.
- Cochard H, Cruiziat P, Tyree MT 1992b.** Use of positive pressures to establish vulnerability curves. Further support for the air-seeding hypothesis and implications for pressure-volume analysis. *Plant Physiology* **100**: 205-209.
- Cochard H, Damour G, Bodet C, Tharwat I, Poirier M, Améglio T 2005.** Evaluation of a new centrifuge technique for rapid generation of xylem vulnerability curves. *Physiologia Plantarum* **124**: 410-418.

- Cochard H, Froux F, Mayr FFS, Coutand C 2004.** Xylem wall collapse in water-stressed pine needles. *Plant Physiology* **134**: 401-408.
- Cochard H, Guilliot A, Tyree MT, Sakr S, Herbette S, Venisse J, Barigah TS, Brunel N 2007.** Putative role of aquaporins in variable hydraulic conductance of leaves in response to light. *Plant Physiol* **143**: 122–133.
- Cochard H, Herbette S, Hernandez E, Holtta T, Mencuccini M 2010.** The effects of sap ionic composition on xylem vulnerability to cavitation. *JExpBot* **61**: 275–285.
- Cochard H, Martin R, Gross P, Bogeat-Triboulot MB 2000b.** Temperature effects on hydraulic conductance and water relations of *Quercus robur* L. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1255-1259.
- Cochard H, Ridolfi M, Dreyer E 1996.** Responses to water stress in an ABA-unresponsive hybrid poplar (*Populus koreana x trichocarpa* cv. Peace) II. Hydraulic properties and xylem embolism. *New Phytologist* **134**: 455-461.
- Cochard H, Tyree MT 1990.** Xylem dysfunction in *Quercus*: vessel sizes, tyloses, cavitation and seasonal changes in embolism. *Tree Physiology* **6**: 393-407.
- Cochard H, Améglio T, Cruiziat P 2001.** The cohesion theory debate continues. *Trends in Plant Science* **6**: 456.
- Cochard H, Lemoine D, Dreyer E 1999.** The effects of acclimation to sunlight on the xylem vulnerability to embolism in *Fagus sylvatica* L. *Plant, Cell and Environment* **22**: 101-108.
- Cochard H, Peiffer M, Le Gall K, Granier A 1997.** Developmental control of xylem hydraulic resistances and vulnerability to embolism in *Fraxinus excelsior* L. Impacts on water relations. *Journal of Experimental Botany* **48**: 655-663.
- Coleman HD, Lacey SA, Robert DG, Shawn DM 2008.** Perturbed Lignification Impacts Tree Growth in Hybrid Poplar-A Function of Sink Strength, Vascular Integrity, and Photosynthetic Assimilation. *Plant Physiology* **148**: 1229–1237.
- Cordero RA, Nilsen E T 2002.** Effects of summer drought and winter freezing on stem

hydraulic conductivity of *Rhododendron* species from contrasting climates. *Tree Physiol* **22**: 919–928.

Cosgrove DJ 2001. Wall structure and wall loosening: a look backwards and forwards. *Plant Physiol* **125**:131–134.

Cosgrove DJ 2005. Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol.Cell Biol* **6**: 850–861.

Crombie DS, Hipkins MF, Milburn JA 1985. Gas penetration of pit membranes in the xylem of *Rhododendron* as the cause of acoustically detected sap cavitation. *Aust J Plant Physiol* **12**: 445–453.

(D)

Dekker RFH 1985. «Biodegradation of the hemicelluloses», *Biosynthesis and Biodegradation of wood components*, Chapitre **18**.

Delmer DP, Amor Y 1995. Cellulose Biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 987-1000.

Demura T, Tashiro G, Horiguchi G, Kishimoto N, Kubo M, Matsuoka N, Minami A, Nagata Hiwatashi M, Nakamura K, Okamura Y 2002. Visualization by comprehensive microarray analysis of gene expression programs during transdifferentiation of mesophyll cells into xylem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:15794-15799.

Derbyshire P, McCann MC, Roberts K 2007. Restricted cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. *BMC Plant Biol* **7**: 31.

Derbyshire P, McCann MC, Roberts K 2007. Restricted cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. *BMC Plant Biol* **7**: 31.

Dervilly-Pinel G, Thibault JF, Saulnier L 2001. Experimental evidence for a semi-flexible conformation for arabinoxylans. *Carbohydrate Research* **330**: 365-372.

Dickison WC 2000. *Integrative Plant Anatomy*. Massachusetts: Harcourt/Academic Press.

Dixon HH, Joly J 1895. On the ascent of sap. *Philos Trans R Soc Lond* **186**: 563–576.

Domec JC, Gartner BL 2001. Cavitation and water storage capacity in bole xylem segments of mature and young Douglas-fir trees. *Trees Struct Funct* **15**: 204–214.

(E)

Ennajeh M, Tounekti T, Vadel AM, Khemira H, Cochard H 2008. Water relations and drought-induced embolism in two olive (*Olea europaea* L.) varieties ‘Meski’ and ‘Chemlali’ under severe drought conditions. *Tree Physiology* **28**: 971-976.

Ewers FW 1985. Xylem structure and water conduction in conifer trees, dicot trees, and lianas. *Int Assoc Wood Anat Bull* **6**: 309- 317.

Ewers, FW, Améglio T, Cochard H, Martignac M, Vandame M, Bodet C, Cruiziat P 2001. Seasonal variation of xylem pressure in walnut trees: root and stem pressure. *Tree Physiol* **21**: 1123–1132.

Ezaki N, Kido N, Takahashi K, Katou K 2005. The role of wall Ca²⁺ in the regulation of wall extensibility during the acid-induced extension of soybean hypocotyl cell walls. *Plant Cell Physiol* **46**: 1831–1838.

(F)

Fengel D, Wegener G 1984. Wood chemistry, Ultrastructure, Reactions. Berlin, Walter de Gruyter.

Fengel D, Wegener G 2003. Wood chemistry, ultrastructure, reactions. Reprint (once de Gruyter). Kessel, Remagen.

Franks PJ, Gibson A, Bachelard EP 1995. Xylem permeability and embolism susceptibility in seedlings of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. from two different climatic zones. *Aust. J. Plant Physiol* **22**:15–21.

Freudenberg K. 1965. Lignin: its constitution and formation from p-hydroxycinnamyl alcohols. *Science* **148**:595-600.

Fromm J, Rockel B, Lautner S, Windeisen E, Wanner G 2003. Lignin distribution wood cell walls determined by TEM and backscattered SEM techniques. *Journal of*

Structural Biology **143**: 77–84.

(G)

Gaffé J, Morvan C, Jauneau A, Demarty M 1992. Partial purification of flax cell wall pectin methylesterase. *Phytochem* **31**:761-765.

Gartner BL 1991a. Is the climbing habit of poison oak ecotypic? *functional ecological* **5**: 696-704.

Gartner BL 1991b. Stem hydraulic-properties of vines vs shrubs of western poison oak. *Toxicodendron diversilobum*. *Oecologia* **87**: 180-189.

Gartner BL 1991c. Structural stability and architecture of vines vs shrubs of poison oak. *Toxicodendron diversilobum*. *Oecologia* **72**: 2005-2015.

Gindl W 2001. The effect of lignin on the moisture-dependent behavior of spruce wood in axial compression. *J. Mat. Sci. Lett* **20**: 2161-2162.

Giovane A, Quagliuolo L, Castaldo D, Servillo L, Balestrieri C 1990. Pectin methylesterase from *Actinidia chinensis* fruits. *Phytochem* **29**:2821-2823.

Guillon F, Philippe S, Bouchet B, Devaux MF, Frasse P, Jones B, Bouzayen M, Lahaye M 2008. Down-regulation of an Auxin Response Factor in the tomato induces modification of fine pectin structure and tissue architecture. *J. Exp. Bot* **59**: 273-288.

(H)

Hacke U, Sauter JJ 1996. Drought-induced xylem dysfunction in petioles, branches, and roots of *Populus balsamifera* L. and *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Plant Physiol* **111**:413–417.

Hacke UG, Jacobsen AL, Pratt RB 2009. Xylem function of arid-land shrubs from California, USA: an ecological and evolutionary analysis. *Plant, Cell & Environment* **32**: 1324-1333.

Hacke UG, Sperry JS, Pockman WT, Davis SD, McCulloh KA 2001. Trends in wood density and structure are linked to prevention of xylem implosion by negative

- pressure. *Oecologia* **126**: 457-461.
- Hacke UG, Sperry JS, Wheeler JK, Castro L 2006.** Scaling of angiosperm xylem structure with safety and efficiency. *Tree Physiology* **26**: 619–701.
- Hacke UG, Stiller V, Sperry JS, Pittermann J, McCulloh KA 2001.** Cavitation fatigue: embolism and refilling cycles can weaken the cavitation resistance of xylem. *Plant Physiol* **125**: 779–786.
- Hadfield KA, Bennett AB 1998.** Polygalacturonases: many genes in search of a function. *Plant Physiol* **117**:337-343.
- Hafren J, Daniel G, Westermarck U 2000.** The distribution of acidic and esterified pectin in cambium, developing xylem and mature xylem of *Pinus sylvestris*. *IAWA J* **21**: 157–168.
- Handford MG, Baldwin TC, Goubet F, Prime TA, Miles JN, Yu X, Dupree P 2003.** Localisation and characterisation of cell wall mannan polysaccharides in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **218**: 27-36.
- Harding SA, Leshkevich J, Chiang VL, Tsai CJ 2002.** Differential substrate inhibition couples kinetically distinct 4-coumarate: coenzyme A ligases with spatially distinct metabolic roles in quaking aspen. *Plant Physiol* **128**:428-38.
- Hargrave KR, Kolb KJ, Ewers FW, Davis SD 1994.** Conduit diameter and drought-induced embolism in *Salvia mellifera* Greene (Labiatae). *New Phytologist* **126**: 695 –705.
- Harholt J, Jensen JK, Sorensen SO, Orfila C, Pauly M, Scheller HV 2006.** ARABINAN DEFICIENT 1 is a putative arabinosyltransferase involved in biosynthesis of pectic arabinan in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **140**: 49–58.
- Hartley RD, Jones EC 1977.** Phenolic components and degradability of cell wall of grass and legume species. *Phytochemistry* **16**: 1531-1534.
- Harvey HP, Van den Driessche R 1997.** Nutrition, xylem cavitation and drought resistance in hybrid poplar. *Tree Physiology* **17**:647–654.

- Harvey HP, Van den Driessche R 1999.** Nitrogen and potassium effects on xylem cavitation and water-use efficiency in poplars. *Tree Physiol* **19**:943–950.
- Hasunuma T, Fukusaki E, Kobayashi A 2004.** Expression of fungal pectin methylesterase in transgenic tobacco leads to alteration in cell wall metabolism and a dwarf phenotype *J Biotechnol* **111**: 241-251.
- Herbette S , Wortemann R , Awad H , Huc R , Cochard H , Barigah TS 2010.** Insights into xylem vulnerability to cavitation in *Fagus sylvatica* L.: phenotypic and environmental sources of variability. *Tree Physiology* **30**:1448-1455.
- Herbette S, Cochard H 2010.** Calcium Is a Major Determinant of Xylem Vulnerability to Cavitation. *Plant Physiology* **153**: 1–8.
- Hertzberg M, Aspeborg H, Schrader J, Andersson A, Erlandsson R, Blomqvist K, BhaleraoR, Uhlén M, Teeri TT, Lundeberg J, Sundberg B, Nilsson P, Sandberg G 2001.** A transcriptional roadmap to wood formation. *PNAS* **98**: 14732-14737.
- Hoch G 2007.** Cell wall hemicelluloses as mobile carbon stores in non-reproductive plant tissues. *Functional Ecology* **21**: 823–834.
- Holbrook NM, Zwieniecki MA 1999.** Embolism repair and xylem tension: Do we need a miracle? *Plant Physiol* **120**:7–10.

(J)

- Jacobsen AL, Esler KJ, Pratt RB, Ewers FW 2009.** Water stress tolerance of shrubs in Mediterranean-type climate regions: convergence of fynbos and succulent karoo communities with California shrub communities. *American Journal of Botany* **96**: 1445-1453.
- Jacobsen AL, Ewers FW, Pratt RB, Paddock WA, Davis SD 2005.** Do xylem fibers affect vessel cavitation resistance? *Plant Physiology* **139**: 546-556.
- Jagels R, Visscher GE 2006.** A synchronous increase in hydraulic conductive capacity and mechanical support in conifers with relatively uniform xylem structure. *American Journal of Botany* **93**: 179-187.

Jagels R, Visscher GE, Lucas J, Goodell B 2003. Paleo-adaptive properties of the xylem of *Metasequoia* : mechanical /hydraulic compromises. *Ann. Bot* **92**: 79–88.

Jansen S, Choat B, Pletsers A 2009. Morphological variation of intervessel pit membranes and implications to xylem function in angiosperms. *American Journal of Botany* **96**: 409–419.

(K)

Kitin P, Voelker SL, Meinzer FC, Beeckman H, Strauss SH, Lachenbruch B 2010. Tyloses and Phenolic Deposits in Xylem Vessels Impede Water Transport in Low-Lignin Transgenic Poplars: A Study by Cryo-Fluorescence Microscopy. *Plant Physiology* **154**: 887–898.

(L)

Ladjal M, Huc R, Ducrey M 2005. Drought effects on hydraulic conductivity and xylem vulnerability to embolism in diverse specie and provenances of Mediterranean cedars. *Tree Physiol* **25**:1109–17.

Lapierre C, Pollet B, Petit-Conil M, Toval G, Romero J, Pilate G, Leplé J-C, Boerjan W, Ferret V, De Nadai V, Jouanin L 1999. Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid *O*-methyl-transferase activity have opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. *Plant Physiology* **119**: 153–163.

Lemoine D, Cochard H, Granier A 2002. Within crown variation in hydraulic architecture in beech (*Fagus sylvatica* L.): evidence for a stomatal control of embolism. *Ann Sci* **59**: 19–27.

Lemoine D, Granier A, Cochard H 1999. Mechanism of freezeinduced embolism in *Fagus sylvatica* L. *Trees* **13**:206–210.

Lens F, Endress ME, Baas P, Jansen S, Smets E 2009. Vessel grouping patterns in subfamilies Apocynoideae and Periplocoideae confirm phylogenetic value of wood structure within Apocynaceae. *American Journal of Botany* **96**: 2168–2183.

- Lens F, Gasson P, Smets E, Jansen S 2003.** Comparative wood anatomy of epacrids (Styphelioideae, Ericaceae s.l.). *Annals of Botany* **91**: 835–856.
- Lens F, Luteyn JL, Smets E, Jansen S 2004.** Ecological trends in the wood anatomy of Vaccinioideae (Ericaceae s.l.). *Flora* **199**: 309–319.
- Leplé J-C, Grima-Pettenati J, Van Montagu M, Boerjan W 1998.** A cDNA encoding cinnamoyl-CoA reductase from *Populus trichocarpa* (Accession No. AJ224986) (PGR98-121). *Plant Physiology* **117**: 1126.
- Lichtenegger H, Reiterer A, Stanzl-Tschegg SE, Fratzl P 1999.** Variation of cellulose microfibril angles in softwoods and hardwoods - A possible strategy of mechanical optimization. *Journal of Structural Biology* **128**: 257-269.
- Lindström H, Evans JW, Verrill SP 1998.** Influence of cambial age and growth conditions on microfibril angle in young Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Holzforschung* **52**: 573–581.
- Lu HY, Wu NQ, Liu DS, Han JM, Qin XG, Sun XJ, Wang YJ 1996.** Seasonal climatic variation recorded by phytolith assemblages from the Baoji loess sequence in central China over the last 150,000 a. *Science in China (Series D)*. **39**: 629– 639.

(M)

- MacDonald HM, Evans R, Spencer WJ 1993.** Purification and properties of the major pectinesterases in lemon fruits (*Citrus limon*). *J. Sci. Food Agric.* **62**: 163-168.
- Maherali H, De Lucia EH 2000.** Xylem conductivity and vulnerability to cavitation of ponderosa pine growing in contrasting climates. *Tree Physiology* **20**: 859-867.
- Maherali H, Moura CF, Caldiera MC, Willson CJ, Jackson RB 2006.** Functional coordination between leaf gas exchange and vulnerability to xylem cavitation in temperate forest trees. *Plant, Cell & Environment*. **29**: 571–583.
- Maherali H, Pockman WT, Jackson RB 2004.** Adaptive variation in the vulnerability of woody plants to xylem cavitation. *Ecology*. **85**: 2184–2199.

- Marcus SE, Verherthbruggen Y, Hervé C, Ordaz-Ortiz J-J, Farkas V, Henriette L, Pedersen HL, Willats WGT, Knox J-P 2008.** Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biol* **8**: 60-72.
- Mareck A, Gaffé J, Morvan O, Alexandre C, Morvan C 1995.** Characterization of isoforms of pectin methylesterase of *Linum usitatissimum* using polyclonal antibodies. **36(3)**: 409-417.
- Markovic O, Janecek S 2001.** Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities and evolution. *Protein Eng* **14**:615-631.
- Marron, N, Maury S, Rinaldi C, Brignolas F 2006.** Impact of drought and leaf development stage on enzymatic antioxidant system of two *Populus deltoides* x *nigra* clones. *Ann. For. Sci.* **63**: 1-5.
- Martinez-Vilalta J, Cochard H, Mencuccini M, et al 2009.** Hydraulic adjustments of Scots pine across Europe. *New Phytologist* **184**: 353-364.
- Martínez-Vilalta J, Prat E, Oliveras I, Piñol J 2002.** Xylem hydraulic properties of roots and stems of nine Mediterranean woody species. *Oecologia* **133**: 19-29.
- Matoh T, Takasaki M, Takabe K 2000.** Boron nutrition of cultured tobacco BY-2-cells. III. Characterization of boron rhamnogalacturonan II complex in cells acclimated to low levels of boron, *Plant and Cellular Physiology*. **41**: 363-366.
- Mazeau K, Moine C, Krausz P, Gloaguen V 2005.** Conformational analysis of xylan chains. *Carbohydrate Polymers*. **340**: 2752-2760.
- McNeil M, Darvill AG, Fry S, Albersheim CP 1984.** Structure and Function of the Primary Cell Walls of Plants *Annu. Rev. Biochem.* **53(1)**: 625-663.
- Mencuccini M, Grace J, Fioravanti M 1997.** Biomechanical and hydraulic determinants of tree structure in scots pine. *Anatomical characteristics. Tree Physiology*. **17**: 105-113.
- Meylan BA, Probine MC 1969.** Microfibril angle as a parameter in timber quality assessment. *For. Prod J* **19**: 31–34.

Micheli F 2001. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology Trends in Plant Science **6**: 414-419.

Milburn JA, Johnson RPC 1966. The conduction of sap. 11. Detection of vibrations produced by sap cavitation in *Ricinus* xylem. Planta **69**: 43.

Miller JC, Fry SC 1992. Production and harvesting of ionically wall-bond extensin from living cell. expansion cultures. Plant Cell Tiss Cult **31**: 61-66.

(N)

Navi P, Heger F 2005. Comportement thermo-hydrromécanique du bois. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne

Neufeld HS, Grantz DA, Meinzer FC, Goldstein G, Crisota GM, Crisosto C 1992. Genotypic variability in vulnerability of leaf xylem to cavitation in water-stressed and well-irrigated sugarcane. Plant Physiol **100**:1020-1028.

Niklas KJ 1997. Mechanical properties of black locust (*Robinia pseudoacacia*) wood. Correlations among elastic and rupture moduli, proportional limit, and tissue density and specific gravity. Annals of Botany **79**: 479-485.

(O)

OBro J, Harholt J, Scheller HV, Orfila C 2004. Rhamnogalacturonan I in *Solanum tuberosum* tubers contains complex arabinogalactan structures. Phytochemistry **65**(10):1429-38.

(P)

Pammenter NW, van der Willigen CV 1998. A mathematical and statistical analysis of the curves illustrating vulnerability of xylem to cavitation. Tree Physiol **18**: 589–593.

Parre E, Geitmann A 2005. Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*. Planta **220**: 582–592.

Pelloux J, Rusterucci C, Mellerowicz EJ 2007. New insights into pectin methylesterase structure and function. Trends Plant Sci **12**: 267–277.

Perez S, Rodriguez-Carjaval MA, Doco T 2003. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function, *Biochimie* **85**: 109-121.

Pickard WF 1981. The ascent of sap in plants. *Prog Biophys Mol Biol* **37**: 181–229.

Pilate G, Guiney E, Holt K, Petit-Conil M, Lapierre C, Leple J, Pollet B, Mila I, Webster EA, Marstorp HG, Hopkins DW, Jouanin L, Boerjan W, Schuch W, Cornu D, Halpin C (2002) Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. *Nat. Biotechnol* **20**: 607–612.

Plavcova L, Hacke G, Sperry J 2011. Linking irradiance-induced changes in pit membrane ultrastructure with xylem vulnerability to cavitation. *Plant, cell and environment* **34**: 501-513.

Pockman WT, Sperry JS 2000. Vulnerability to cavitation and the distribution of Sonoran desert vegetation. *American Journal of Botany* **87**:1287-1299.

Pratt RB, Jacobsen AL, Ewers FW, Davis SD 2007. Relationships among xylem transport, biomechanical and storage in stems and roots of nine Rhamnaceae species of the California chaparral. *New Phytologist* **174**: 787-798.

Proseus TE, Boyer JS 2006. Calcium pectate chemistry controls growth rate of *Chara corallina*. *J Exp Bot* **57**: 3989–4002.

(R)

Reis D, Vian B 2004. Helicoidal pattern in secondary cell walls and possible role of xylans in their construction. *Comptes-Rendus Biologies* **327**: 785-790.

Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**: 929-967.

Rosner S, Klein A, Muller U, Karlsson B 2007. Hydraulic and mechanical properties of young Norway spruce clones related to growth and wood structure. *Tree Physiology* **27**: 1165–1178.

Rosner S, Klein A, Muller U, Karlsson B 2008. Tradeoffs between hydraulic and

mechanical stress responses of mature Norway spruce trunk wood. *Tree Physiology* **28**: 1179-1188.

(S)

Sack L, Holbrook NM 2006. Leaf hydraulics. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 361–381.

Sakakibara A 1980. Structural model of softwood lignin. *Wood Sci. Technol* **14**: 89-100.

Sakakibara A 1991. Chemistry of lignin. In: Hon, D.N.-S., Shiraishi, N. (Eds.), *Wood and Cellulosic Chemistry*. Marcel Dekker, New York 113–175.

Salleo S, Nardini A, Pitt F, Lo Gullo MA 2000. Xylem cavitation and hydraulic control of stomatal conductance in laurel (*Laurus nobilis* L.). *Plant Cell Environ* **23**:71–79.

Sarkanen KV, Hergert HK 1971. Classification and distribution. In: Sarkanen KV, Ludwig CH (eds) *Lignins, occurrence, formation, structure and reactions*. Wiley, New York 43–94

Schmid G, Grisebach H 1982. Enzymatic synthesis of lignin precursors. Purification and properties of UDP glucose: coniferyl-alcohol glucosyltransferase from cambial sap of spruce (*Picea abies* L.). *Eur J Biochem* **123**: 363-370.

Schmid R 1965. Fine structure of pits in hardwoods. In: Côté WA, ed. *Cellular ultrastructure of woody plant*. New York, NY: Syracuse University Press 291–304.

Schmid R, Machado RD 1968. Pit membranes in hardwoods-fine structure and development. *Protoplasma* **66**: 185–204.

Shimizu K 1991. Chemistry of hemicelluloses. In *Wood and cellulosic chemistry*, Hon D.N.S., S. N., Ed. Marcel Dekker: New York 177-214.

Showalter AM 1993. Structure and function of plant cell wall protein. *Plant Cell* **5**: 5-23.

Showalter AM 2001. Introduction: plant cell wall proteins. *Cell Mol Life Sci* **587**: 1361-1362.

Siau JF 1984. *Transport process in wood*. Berlin: Springer-verlag.

- Siedlecka A, et al. 2008.** Pectin methyl esterase inhibits intrusive and symplastic cell growth in developing wood cells of *Populus*. *Plant Physiol* **146**: 554–565.
- Sirviö J, Kärenlampi P 1998.** Pits as natural irregularities in softwood fibers. *Wood Fiber Sci* **30**: 27–39.
- Sitrit Y, Hadfield KA, Bennett AB, Bradford KJ, Downie AB 1999.** Expression of a polygalacturonase associated with tomato seed germination. *Plant Physiol* **121**:419-428.
- Somerville C 2006.** Cellulose synthesis in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 53–78.
- Sparks JP, Black A 1999.** Regulation of water loss in populations of *Populus trichocarpa*: the role of stomatal control in preventing xylem cavitation. *Tree Physiol* **19**: 453–459.
- Sperry JS 1993.** Winter xylem embolism and spring recovery in *Betula cordifolia*, *Fagus grandifolia*, *Abies balsamea* and *Picea rubens*. In *Water transport in plants under climatic stress*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K 86–98.
- Sperry JS 2000.** Hydraulic constraints on plant gas exchange. *Agric. Forest Meteorol* **104**:13-23.
- Sperry JS, Donnelly JR, Tyree MT 1988.** A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant Cell Environ* **11**: 35–40.
- Sperry JS, Hacke UG 2004.** Analysis of circular bordered pit function-I. Angiosperm vessels with homogenous pit membranes. *Am J Bot* **91**: 369–385.
- Sperry JS, Hacke UG, Pittermann J 2006.** Size and function in conifer tracheids and angiosperm vessels. *Am J Bot* **93**: 1490–1500.
- Sperry JS, Nicols KL, Sullivan JEM, Eastlack SE 1994.** Xylem embolism in ring-porous, diffuse-porous, and coniferous trees of northern Utah and interior Alaska. *Ecology* **75**:1736–1752.
- Sperry JS, Perry AH, Sullivan JEM 1991.** Pit membrane degradation and air-embolism formation in aging xylem vessels of *Populus tremuloides* Michx. *J Exp Bot* **42**: 1399–1406.

Sperry JS, Saliendra NZ 1994. Intra- and inter-plant variation in xylem cavitation in *Betula occidentalis*. *Plant, Cell & Environment* **17**: 1233 –1241.

Sperry JS, Sullivan JEM 1992. Xylem embolism in response to freeze–thaw cycles and water stress in ring-porous, diffuse-porous, and conifer species. *Plant Physiol* **100**: 605–613.

Sperry JS, Tyree MT 1988. Mechanism of water-stress-induced xylem embolism. *Plant Physiology* **88**: 581-587.

Sperry JS, Tyree MT 1990. Water-stress-induced xylem embolism in three species of conifers. *Plant, Cell Environ* **13**: 427-436.

Staelin LA , Moore I 1995. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**: 261-288.

Sterling J, Quigley HF, Orellana A, Mohnen D 2001. The catalytic site of the pectin biosynthetic enzyme α -1,4-galacturonosyltransferase (GalAT) is located in the lumen of the Golgi. *Plant Physiol* **127**:360-371.

Steudle E 2000. Water uptake by roots: effects of water deficit. *J Exp Bot* **350**: 1531–1542.

Steudle E 2001. The cohesion-tension mechanism and the acquisition of water by plants roots. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 847–875.

(T)

Tissier J, Lambs L, Peltier JP, Marigo G 2004. Relationships between hydraulic traits and habitat preference for six *Acer* species occurring in the French Alps *Ann. For. Sci.* **61**:81–86.

Torki M, Mandaron P, Mache R, Falconet D 2000. Characterization of a ubiquitous expressed gene family encoding polygalacturonase in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **242**:427-436.

Tuskan GA et al. 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. and Gray). *Science* **313**: 1596-1604.

Tyree MT, Cochard H, Cruiziat P, Sinclair B, Améglio T 1993. Drought induced leaf

shedding in walnut: evidence for vulnerability segmentation. *Plant Cell Environ* **16**:879–882.

Tyree MT, Davis SD, Cochard H 1994. Biophysical perspectives of xylem evolution: is there a trade-off of hydraulic efficiency for vulnerability to dysfunction? *IAWA Journal* **15**: 335-360.

Tyree MT, Sperry JS 1988. Do woody plant operate near the point of catastrophic xylem dysfunction caused by dynamic water stress? *Plant Physiol* **88**: 574–580.

Tyree MT, Sperry JS 1989. Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**: 19–38.

Tyree MT, Cochard H 1996. Summer and winter embolism in oak. Impact on water relations. *Annales des Sciences Forestières* **53**: 173-180.

Tyree MT, Cochard H, Cruiziat P 2003. The water-filled versus air-filled status of vessels cut open in air: The 'Scholander assumption' revisited. *Plant Cell and Environment* **26**:613-621.

(U)

Utsumi Y, Bobich EG, Ewers FW 2010. Photosynthetic, hydraulic and biomechanical responses of *Juglans californica* shoots to wildfire. *Oecologia* **164**: 331:338.

(V)

Valladares F, Gianoli E, Gómez JM 2007. Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *Tansley Review, New Phytologist* **176**: 749-763.

Van holst GJ, Varner JE 1984. Reinforced polyproline II conformation in a hydroxylproline-rich cell wall glycoprotein from carrot root. *Plant physiol* **74**: 247-251.

VanDoorsselaere J, Baucher M, Chognot E, Chabbert B, Tollier MT, PetitConil M, Leple JC, Pilate G, Cornu D, Monties B, VanMontagu M, Inze D, Boerjan W, Jouanin L 1995. A novel lignin in poplar trees with a reduced caffeic acid 5-

hydroxyferulic acid O-methyltransferase activity. *Plant Journal* **8**: 855-864.

Vincken J-P, Schols HA, Oomen RJFJ, McCann MC, Ulvskov P, Voragen AGJ, Visser RGF 2003. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol* **132**:1781–1789.

(W)

Wagner KR, Ewers FW, Davis SD 1998. Tradeoffs between hydraulic efficiency and mechanical strength in the stems of four co-occurring species of chaparral shrubs. *Oecologia* **117**: 53-62.

Wen F, Zhu Y, Hawes MC 1999. Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development. *Plant Cell* **11**: 1129–1140.

Wheeler JK, Sperry JS, Hacke UG, Hoang N 2005. Intervessel pitting and cavitation in woody Rosaceae and other vesselless plants: a basis for a safety versus efficiency trade-off in xylem transport. *Plant, Cell & Environment* **28**: 800–812.

Woodrum CL, Ewers FW, Telewski FW 2003. Hydraulic, biomechanical, and anatomical interactions of xylem from five species of *Acer* (Aceraceae). *American Journal of Botany* **90**: 693–699.

(Y)

Yang KC 1978. The fine structure of pits in yellow birch (*Betula allaghaniensis* Britton). *IAWA Bull* **4**:71–77.

Yui T, Imada K, Shibuya N, Ogawa K 1995. Conformation of an arabinoxylan isolated from the rice endosperm cell wall by X-ray diffraction and a conformational analysis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **59**: 965-968.

(Z)

Zhang GF, Staehelin LA 1992. Functional compartmentation of the Golgi apparatus of plant cells. Immunocytochemical analysis of high-pressure frozen and freeze-substituted sycamore maple suspension culture cells. *Plant Physiol* **99**:1070-1083.

- Zimmermann MH 1983.** Xylem structure and the ascent of sap. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo 143.
- Zimmermann MH, Brown CL 1971.** Trees: Structure and function. Springer-Verlag, New York, New York, USA.
- Zimmermann U, Schneider H, Wegner LH, Haase A 2004.** Water ascent in tall trees: does evolution of land plants rely on a highly metastable state? *New Phytologist* **162**: 575 – 615.
- Zotz G, Tyree MT, Cochard H. 1994.** Hydraulic architecture, water relations and vulnerability to cavitation of *Clusia uvitana*: a C3-CAM tropical hemiepiphyte. *New Phytologist* **127**: 87-295.
- Zwieniecki MA, Holbrook NM 2009.** Confronting Maxwell's demon: biophysics of xylem embolism repair. *Trends Plant Sci* **14**: 530–534.

Annexe

Insights into xylem vulnerability to cavitation in *Fagus sylvatica* L.: phenotypic and environmental sources of variability

STEPHANE HERBETTE,^{1,2,4} REMI WORTEMANN,^{1,2} HOSAM AWAD,^{1,2} ROLAND HUC,³ HERVE COCHARD^{1,2} and TETE SEVERIEN BARIGAH^{1,2}

¹ Université Blaise Pascal, UMR 547 PIAF, avenue des Landais, F-63177 Aubière, France

² INRA, UMR 547 PIAF, F-63100 Clermont-Ferrand, France

³ INRA, UR629 Recherches Forestières Méditerranéennes, F-84000 Avignon, France

⁴ Corresponding author (stephane.herbette@univ-bpclermont.fr)

Received February 5, 2010; accepted August 10, 2010; published online October 8, 2010; handling Editor Nathan Phillips

Summary Xylem vulnerability to cavitation is a key parameter in understanding drought resistance of trees. We determined the xylem water pressure causing 50% loss of hydraulic conductivity (P_{50}), a proxy of vulnerability to cavitation, and we evaluated the variability of this trait at tree and population levels for *Fagus sylvatica*. We checked for the effects of light on vulnerability to cavitation of stem segments together with a time series variation of P_{50} . Full sunlight-exposed stem segments were less vulnerable to cavitation than shade-exposed ones. We found no clear seasonal change of P_{50} , suggesting that this trait was designed for a restricted period. P_{50} varied for populations settled along a latitudinal gradient, but not for those sampled along an altitudinal gradient. Moreover, mountainside exposure seemed to play a major role in the vulnerability to cavitation of beech populations, as we observed the differences along north-facing sides but not on south-facing sides. Unexpectedly, both north-facing mountainside and northern populations appeared less vulnerable than those grown on the southern mountainside or in the South of France. These results on beech populations were discussed with respect to the results at within-tree level.

Keywords: drought tolerance, European beech, hydraulic, phenotypic plasticity, populations, xylem embolism.

Introduction

Global warming models predict that drought will become an increasingly important factor limiting tree growth and survival. Knowledge of factors enabling tree species to occupy different habitats is therefore important. According to Bazzaz (1996), a high degree of ecological variation, i.e., a wide range of different habitats potentially occupied by a species, can be achieved by various means: the species can show a

high degree of genetic variability, comprising genotypes especially adapted to different habitats, or the tree can exhibit phenotypic plasticity in different environments. European beech (*Fagus sylvatica*) is a widespread species of the European temperate forest with a natural range of distribution extending from southern Sweden to central Italy, western France, northern Portugal and central Spain and eastern to north-western Turkey. It dominates natural forests in dry to humid conditions and requires a humid atmosphere and a well-drained soil (Rose et al. 2009). In the Mediterranean basin, beech grows in mountainous regions where rainfall is high, just barely within the limit of its requirements (Garcia-Plazaola and Becerril 2000). In France, beech forests and/or stands occupy broad geographic and altitudinal ranges from plains at sea level up to 1700 m a.s.l. Because of its broad ecological amplitude, European beech is expected to contain variability for many traits such as resistance to cavitation events by its xylem.

It is now clear that xylem dysfunction induced by drought is a serious threat to plant productivity and survival. Comparisons of species growing in contrasting environments suggest that increased cavitation resistance is a key component of species growing in drought-prone habitats (Tyree and Ewers 1991, Pockman and Sperry 2000, Cochard et al. 2008). Correlations between drought resistance and xylem vulnerability to cavitation have been found in groups of woody species with contrasting ecological preferences (Nardini et al. 2000, Sperry and Hacke 2002, Pita et al. 2003, Tyree et al. 2003, Maherali et al. 2004). Xylem vulnerability to cavitation is usually described through vulnerability curves, i.e., the plot of percent loss of xylem hydraulic conductivity against xylem tension. For more than two decades, vulnerability to cavitation has been seen as an intrinsic property of the conductive elements of the xylem (Tyree and Ewers 1991, Tyree et al. 1994, Cochard 2006) and can be evaluated without submitting the plant material to a long period of drought. Consequently, xylem

vulnerability to cavitation has widely been documented across species and has been shown to vary greatly between species (Tyree and Ewers 1991, Maherali et al. 2004, Bréda et al. 2006, Cochard 2006, Froend and Drake 2007, Brodribb and Cochard 2009). To date, reports at the intra-specific level are much scarcer, but resistance to cavitation can vary significantly between populations of the same species (Alder et al. 1996, Sparks and Black 1999, Choat et al. 2007) or between closely related genotypes (Vander Willigen and Pammenter 1998, Sangsing et al. 2004, Cochard et al. 2007), and between organs of the same plant (Tyree et al. 1993, Sperry and Saliendra 1994, Hacke and Sauter 1995, Cochard et al. 1999).

We hypothesized that vulnerability to cavitation varies in tree populations according to their water availability. Recently, we demonstrated in a poplar clone that this trait acclimates to drier soil conditions (Awad et al. 2010). Here, we examined the variability of vulnerability to cavitation in beech at the within-tree level and between in situ populations. First, we assessed the within-tree variation in vulnerability to cavitation due to light and seasonal effects. Then, we compared in situ populations along altitudinal and latitudinal gradients for their vulnerability to cavitation. We hypothesized that vulnerability to cavitation should vary in beech forests both with elevation and along a latitudinal gradient as mountains are steep climate gradients, the altitudinal gradient is often claimed to mirror the latitudinal one (Rahbek 1995, Fosaa 2004).

Materials and methods

Vulnerability to xylem cavitation

We used the Cavitron technique (Cochard et al. 2005) to measure vulnerability to cavitation of stem segments. This technique uses centrifugal force to increase tension in a calibrated stem segment, while variations in its xylem hydraulic conductance are measured. Samples (0.7–0.8 cm in diameter and 28 cm in length) were cut in the air from 50-cm-long stem segments, placed on a custom-built rotor and spun at set velocities. Maximal conductance (k_{\max}) was determined by setting the xylem pressure to a reference value of -1.00 MPa, without having flushed them previously. Xylem pressure was then set to gradually more negative values by 0.50 MPa steps. For each new xylem pressure, a hydraulic conductance (k_{ψ}) value was measured at equilibrium and the percent loss of conductance (PLC) per sample was computed as $\text{PLC} = 100 \times (1 - k_{\psi}/k_{\max})$. This procedure was repeated until PLC reached at least 90%. The rotor velocity was monitored with an electronic tachometer (10 r.p.m. resolution) and xylem pressure was adjusted to approximately ± 0.02 MPa. The dependence of PLC on xylem pressure was used to generate vulnerability curves for each stem segment, which were fitted to the following sigmoid function (Pammenter and Vander

Willigen 1998):

$$\text{PLC} = \frac{100}{1 + \exp(s/25(P - P_{50}))},$$

where P is the water potential, PLC is the corresponding percent loss of conductivity, P_{50} is the negative pressure causing 50% loss of conductance and s is the slope of the curve at its inflection point.

Plant material

Current year plant material from differently aged European beech trees grown in different, contrasting environments were used, according to the questions addressed. Except where specified, we used full sunlight stem segments. They were collected between 9:00 a.m. and 12:00 noon. We used a pruning pole to sample stem segments 50 cm long in the top half of each branch or shoot, according to the tree height. These stem segments were promptly defoliated, wrapped in a wet soft tissue and enclosed in a humid black plastic bag to minimize dehydration and prevent non-steady-state embolism occurring. We brought the stem segments to the laboratory and stored them at 5°C for up to 30 days, i.e., until measurements were completed.

In August 2006, we collected samples within 2 h from a single 7-m-high tree growing in a deciduous Allagnat forest location, to evaluate the length of time stem segments could be stored without impacting on their P_{50} value. To avoid light acclimation effects, we harvested only full sunlight-exposed branches. The samples were wrapped in humid paper and kept at 5°C in a sealed black plastic bag. We used a set of five to six stem segments stored for 0, 3, 6, 7, 8 and 10 weeks to determine P_{50} values in this experiment.

To analyse the effects of light together with seasonal variations in vulnerability to cavitation, four mature trees were chosen in a deciduous forest at the Allagnat location (Table 1). The selected trees grew at the edge of the forest with southern branches fully exposed to sunlight, whereas

Table 1. Name, geographical location and elevation of the study sites.

Name of the forest site, location in France	Global positioning	Altitude (m)/ mountainside	Reference for the study sites
Allagnat, centre	45°45'N, 2° 54'E	1000	Cochard et al. (2005)
Graouilly, north-east	49°04'N, 6° 01'E	300	Piboule et al. (2005)
Hesse, north-east	48°40'N, 7° 03'E	330	Granier et al. (2000)
Mount Ventoux, south-east	44°10'N, 5° 14'E	950/North 1260/North 1520/North 930/South 1250/South 1565/South	Dreyfus (2008)

northern ones were deeply shaded by upper branches and (or) surrounding trees during the growing season. For each light exposure condition, three to five stem segments were collected at different locations in each tree to avoid spatial positioning effects between sampling periods. In these experiments, we used segments that were more than 1 or 2 years old, as the current year shoots were too short to fit the customized centrifuge rotor, especially the shade-exposed ones. P_{50} data collected from the four trees were pooled, and their means and standard errors (SEs) were calculated. For two out of the four trees, we carried out a survey of vulnerability to cavitation for both light- and shade-exposed stem segments ($n = 4$ or 5) for 11 sampling dates between April 2007 and August 2008. The mean and SEs of their P_{50} values were calculated for each tree on each sampling date.

During the 2006 growing season, we selected four beech populations located along a latitudinal gradient from northern to southern France (Graoully, Hesse, Allagnat and Mount Ventoux; Table 1) to investigate the difference in vulnerability to cavitation between in situ populations. The samples, collected from 10 adult tree branches and 9 stems from juveniles in Allagnat, were also used to check for the effects of tree stature on vulnerability to cavitation. As no difference was found between juvenile and adult plants, we pooled the data. We also pooled the data for the Mount Ventoux populations, as a comparison of vulnerability to cavitation made at five elevations along a northern altitudinal gradient revealed no difference in P_{50} for the whole set of samples. One stem segment per tree from 8, 9, 19 and 50 trees in the Graoully, Hesse, Allagnat and Mount Ventoux sites were, respectively, sampled (Table 1) and the mean P_{50} values with their SEs were calculated. These mean and SE values were used as a proxy for each given site. On 14 June 2008, we again harvested six stem segments from different trees at three elevations on north-facing and south-facing mountainsides at the Mount Ventoux site to check for mountainside exposure effects in variability in vulnerability to cavitation. In this site, the sampling was carried out >900 m a.s.l. because only scattered beech trees were available below this baseline.

Statistical analysis

We carried out analysis of variance (ANOVA) to determine whether P_{50} means are significantly different between populations settled along latitudinal and altitudinal gradients. In case of significant differences, we refer to the Tukey's multiple range test at $P < 0.05$ to compare the mean values. To analyse the light effects together with intra-annual variations in P_{50} , a repeated ANOVA was performed based on the factors such as 'light' and 'time'. Then, for each factor, the mean values were compared using the Tukey's multiple range test at $P < 0.05$. We carried out regression analysis to check whether the slope is significantly different from zero at $P < 0.05$ to test samples for any age effect and the conservation delay.

All the measured and derived data underwent statistical analysis using the Statgraphics plus 4.1 software package.

Results

Age effect and conservation delay of severed samples

No significant difference in P_{50} values was observed regarding the age effect of the stem segments (Figure 1a). We also found that beech stem segments stored for 10 weeks at 5 °C in humid dark conditions were still suitable for P_{50} determination (Figure 1b), probably because xylem conduits and the bulky xylem tissue are made of dead cells. Thus, storing stem segments for weeks at low temperature constitutes a great issue for large-scale screening campaigns of vulnerability to cavitation, such as those carried out in this study.

Phenotypic variation of vulnerability to cavitation

Figure 2 shows that the full sunlight-exposed stem segments were significantly less vulnerable to cavitation than the shade-exposed ones. When both types of stem segment of a given tree were considered separately, they differed significantly in their vulnerability to cavitation over the timespan of the survey, except for a few sampling dates (Figure 3). Nevertheless, the full sunlight-exposed stem segments

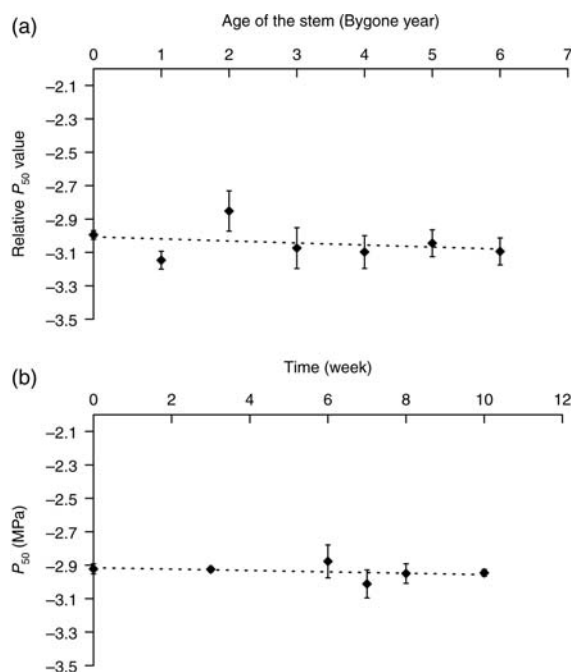


Figure 1. Effects of age of the stem (a) and the conservation time of samples at 5 °C (b) on their vulnerability to cavitation. (a) x-Axis represents the age class of the stem segments (0 is for current year stem, 1 is for stems of more than 1 year old, etc.) and the y-axis represents the P_{50} of the samples relative to the P_{50} mean value of the trees from a given in situ population. Data are means (\pm SE) of 6–131 stem segments. (b) The P_{50} value of stem segments from a single beech tree was determined after 0, 3, 6, 7, 8, 10 weeks of storage at 5 °C wrapped in humid paper. The samples were collected from a single tree within 2 h. Data are means (\pm SE) of four to six stem segments. The lines are linear regressions. Their slopes are not significantly different from 0, with $P = 0.6719$ and 0.6264 , respectively, for (a) and (b).

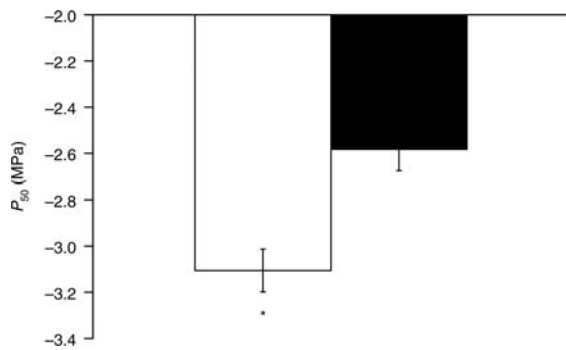


Figure 2. Vulnerability to cavitation of beech shade-exposed (black bars) and full sunlight-exposed stem segments (white bars). The pressure causing 50% loss of conductance (P_{50}) was determined for samples collected from four trees. Data are means (\pm SE) of 16 stems. They were significantly different, $P = 27.3 \times 10^{-6}$.

tended to have more negative P_{50} values compared with those shade exposed. Some significant variations of the vulnerability to cavitation can be observed over time (Figure 3), but these variations were different depending on the tree and no specific seasonal changes were detected. Nevertheless, we observed minor variations in vulnerability to cavitation of the samples during the leafy period, i.e., between June and October, especially in full sunlight-exposed stem segments.

Variability in vulnerability to cavitation between populations along altitudinal and latitudinal gradients

Values of P_{50} differed significantly between most of the populations (Figure 4) growing in France along a north-east to south-east latitudinal gradient (Table 1). The population from the centre of France had intermediate values of P_{50} when compared with both northern (-3.77 MPa) and southern (-2.40 MPa) ones. The largest difference in P_{50} (1.37 MPa) was found between the populations of the Mount Ventoux (southern) and Graouilly (northern) sites. Unexpectedly, the P_{50} values of beech harvested at the northern site were lower than those from the central and southern sites. At the central site, vulnerability to cavitation was similar for stems of juveniles and branches of adult trees. Hence, plant stature probably plays only a minor role in determining beech P_{50} .

Figure 5 shows that populations located on south-facing mountainsides along an altitudinal gradient of Mount Ventoux displayed no statistical changes in their vulnerability to cavitation. In contrast, populations from the north-facing mountainside differed in P_{50} in some cases.

Discussion

Phenotypic plasticity of vulnerability to cavitation

We have shown that vulnerability to cavitation in *F. sylvatica* varies with the exposure of the shoots to sunlight, the shade-exposed stem being more vulnerable to

cavitation than the sun-exposed one (Figures 2 and 3). Our results are in line with those previously reported (Cocharde et al. 1999; Barigah et al. 2006). To grow, European beech, as a shade-tolerant tree species, can take advantage of changes in irradiance, such as those associated with mortality of overstory trees (Stickan and Zhang 1992). Consequently, the tree needs to acclimatize its hydraulic features to use the available light efficiently for carbon gain and resume rapid growth. A high transpiration rate requires a hydraulic system able to sustain large water fluxes, together with the ability to tolerate large water potential differences in the xylem conduits (i.e., low xylem vulnerability to cavitation, Tyree and Ewers 1991). Thus, full sunlight-exposed stems need to be designed with low vulnerability to cavitation so as to support increases in the stomatal conductance and transpiration rate of their leaves.

Regarding the seasonal variations in vulnerability to cavitation, we observed many occurrences of differences between stem segments with different light exposure (Figure 3a and b). These observations suggest that the light exposure of the stems and/or branches played a major role in their hydraulic architecture. Full sunlight- and shade-exposed stem segments generally differed in their P_{50} . However, this observation was unexpected given the environmental conditions, which were prone to significant changes between leafy and leafless periods. During leafless periods, the evaporative demand of the air was assumed to be low and the soil water availability was assumed to be high. The changes in xylem anatomy can occur only in the growing season during wood formation, as xylem conduits are made of dead cells with no short-term capacity to acclimatize or adjust to changes in hydraulic demand. This would explain why no variation in vulnerability to cavitation was observed for samples kept for 5 weeks in humid and dark conditions (Figure 1). Thus, an environmental event such as a frost or a spell of drought that occurs in spring at the time of early wood vessel formation can directly impact on cells undergoing differentiation and thus leave an imprint inside xylem conduits.

We also observed the variations in vulnerability to cavitation in 2007, but the patterns were not similar for the two trees in question (Figure 3). This difference was difficult to explain, as the trees were close to each other and so were assumed to be growing under the same climatic conditions. The observed discrepancy may result from soil heterogeneity, but this did not fit the assumption that in time series of different individuals, the existence of common variability is caused by the influence of a given environmental factor (Fonti et al. 2010).

Phenotypic variability of vulnerability to cavitation in beech populations

In this study, we showed a great variability in the vulnerability to cavitation in *F. sylvatica*, with the greatest difference in the P_{50} values of 1.37 MPa between two populations

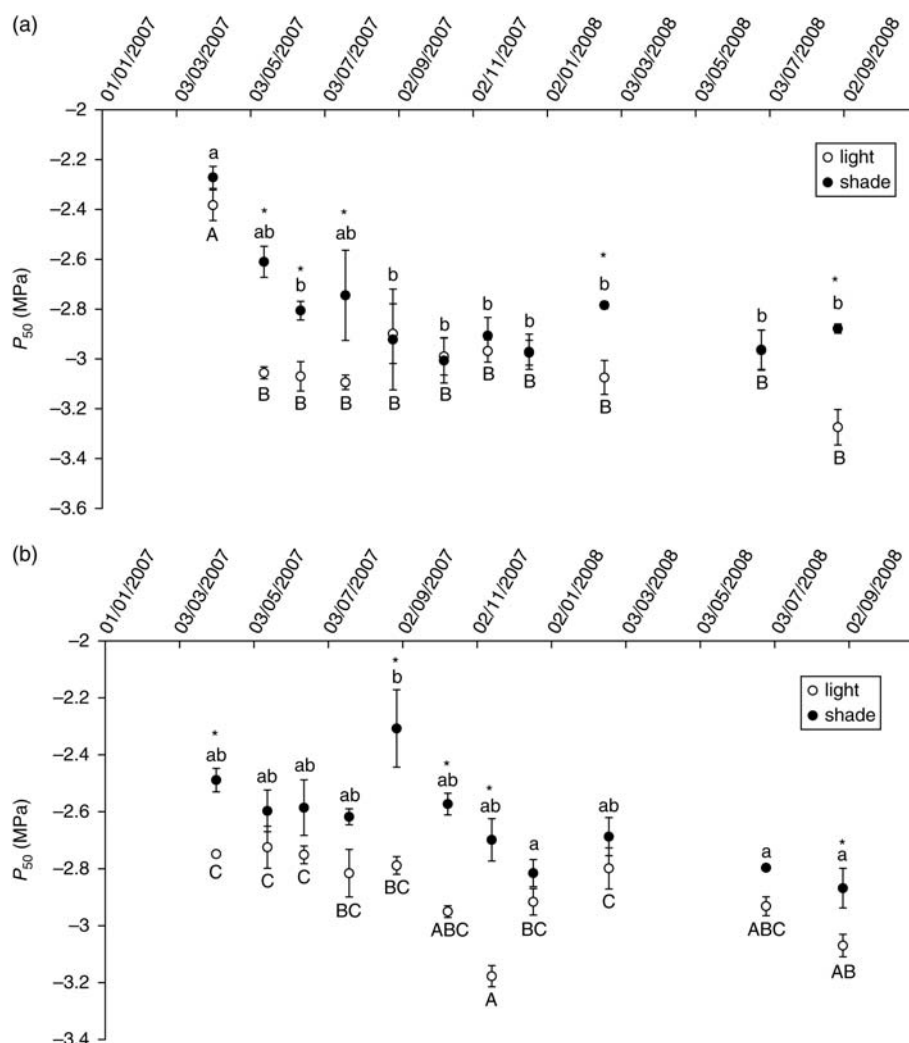


Figure 3. Time course vulnerability to cavitation of shade-exposed (closed circle) and full sunlight-exposed stem segments (open circle) for two trees (a and b). P_{50} values for both shade-exposed and full sunlight-exposed stem segments were determined for 11 sampling days (from April 2007 to August 2008). Data are means (\pm SE) of three to five stems. For each light condition, P_{50} means obtained during the survey were compared. Different upper and lower case letters indicate significant differences for light- and shade-exposed stems, respectively. For each sampling date, P_{50} means were compared between light- and shade-exposed stems and asterisks indicate significant differences, $P < 0.05$.

on two different sites (Figure 5). Such a within-species variability can be attributed to the large ecological amplitude of the beech. In contrast, *Pinus sylvestris*, which is roughly as sensitive as beech, showed limited variability in vulnerability to cavitation between and within populations (Martinez-Vilalta et al. 2009). Such between-population differences in beech can be driven by phenotypic plasticity depending on the environmental conditions and genetic differentiation. According to Hamrick (2004), most of the genetic variation for most traits resides within populations, with few differences between populations. This assumption suggests that environmental factors play a major role in the observed variations between populations for vulnerability to cavitation. We found that beech populations from north-east France were more drought resistant to cavitation than those from the south-east (Figure 4). Although the genetic origins

of our beech populations were not fully known, these results are unexpected. Indeed, the southern French populations occurred at the natural southern limit of beech distribution in a Mediterranean climate (Parelle et al. 2006). This area is characterized by its long droughts, high evaporative demand and energy balance in summer, which would be expected to be detrimental to beech growth and survival. In *P. sylvestris*, the vulnerability to cavitation was not associated with global climate dryness (Martinez-Vilalta et al. 2009). There are two explanations for such a discrepancy between vulnerability to cavitation and the locations of beech populations. First, growth processes may have been favoured for drought resistance instead of vulnerability to cavitation. Many studies have investigated the drought sensitivity of beech populations along geographical gradients of precipitation (Garcia-Plazaola and Becerril 2000, Nielsen and Jorgensen

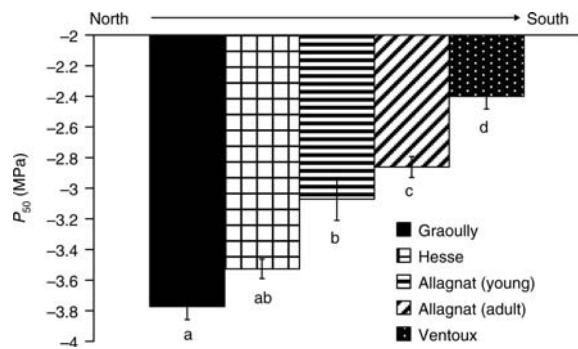


Figure 4. Vulnerability to cavitation in beech populations distributed along a latitudinal gradient. P_{50} values were determined for sampled trees from Graouilly, Hesse, Allagnat and Mount Ventoux forest sites. The arrow indicates the ranking of the populations distributed along the north-to-south direction. For Allagnat site, P_{50} values were determined for juveniles and adult trees. Data are means (\pm SE) of 8–50 stem segments. Only one stem was sampled per tree. Data with sharing different letters are significantly different with $P < 0.05$.

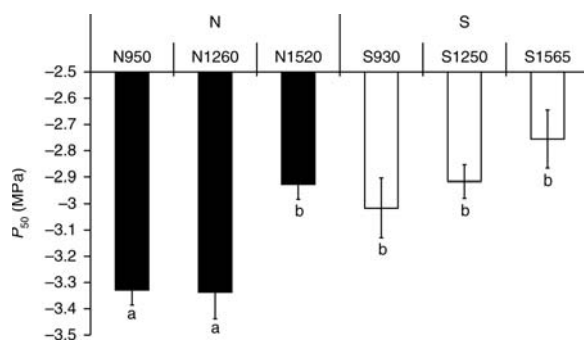


Figure 5. Vulnerability to cavitation in north- and south-facing mountainside beech populations distributed along altitudinal gradients at the Mount Ventoux site. The P_{50} values were determined for trees located on the north (N) side at elevation 950, 1260 and 1520 m, and on the south (S) side at elevation 930, 1250, 1565 m. Data are means (\pm SE) of six stems. Only one stem was sampled per tree. Data with different letters are significantly different with $P < 0.05$.

2003, Rose et al. 2009). From these studies, it was concluded that a higher tolerance to drought stress in southern populations is based on morphological and growth parameters, such as acorn mass for seedlings and root/shoot ratio for mature trees rather than on a better photoprotective system. This assumption could explain the lack of correlation between vulnerability to cavitation and altitudinal distribution. For example, *Populus euphratica*, one of the tree species most vulnerable to cavitation, is able to grow in arid areas because of its ability to access deep water tables (Hukin et al. 2005). According to Mayr et al. (2007), freezing and drought-induced embolism proceed by the same mechanism. Consequently, we suggest that the low P_{50} values observed in north-east and central populations could result from an acclimation to the occurrences of both low-temperature (winter) and severe drought episodes (summer)

which take place frequently in these areas. Secondly, we observed, on the one hand, that vulnerability to cavitation did not vary much throughout the seasons (Figure 2) and, on the other hand, that no change in vulnerability to cavitation occurs over the 10 weeks the severed stems were stored in humid and dark conditions (Figure 1b). Because vulnerability to cavitation might rely on the environmental conditions prevailing during xylem vessel formation, differences in vulnerability to cavitation between populations depend on environmental conditions of both limited time and their respective phenology. To support this, we recently showed that vulnerability to cavitation acclimates to drier soil conditions if poplar trees are grown under different water regimes (Awad et al. 2010).

Variability in vulnerability to cavitation due to mountain-side exposure seemed to be typically higher than that due to altitudinal distribution. Light exposure seemed to play a major role, as populations growing at 1520 m a.s.l. on the north-facing mountainside had a vulnerability to cavitation similar to that of beeches distributed over the entire south-facing mountainside. Both mountainside effects and altitudinal gradients are complex and involve many different co-varying factors, such as topography, soil and climatic variables such as temperature, precipitation, sun and wind (Austin et al. 1996). It emerged from our data sets that European beech was able to display different degrees of phenotypic variability along geographic zones, but to a lesser extent along an altitudinal gradient (Figures 4 and 5).

Conclusions

Our results show that the changes in vulnerability to cavitation occur both within trees and between in situ populations. This trait seems to be at least partially governed by environmental conditions such as light exposure, probably those prevailing during wood formation and xylem conduit differentiation. This hinders the interpretation of the relationship between vulnerability to cavitation and environmental conditions especially the water availability. The correlation between vulnerability to cavitation and drought resilience found between species appears to be less relevant at the within-species level. From a methodological point of view, the weak variations through the seasons and the conservation delay of the samples make large-scale analyses of the vulnerability to cavitation feasible.

Funding

This research was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique and by the INRA project EcoGER (Project Forêts Melangees, Grant BTH01667).

References

- Alder, N.N., J.S. Sperry and W.T. Pockman. 1996. Root and stem xylem embolism, stomatal conductance and leaf turgor in *Acer grandidentatum* populations along a soil moisture gradient. *Oecologia* 105:293–301.

- Austin, M.P., J.G. Pausas and A.O. Nicholls. 1996. Patterns of tree species richness in relation to environment in south-eastern New South Wales, Australia. *Aust. J. Ecol.* 21:154–164.
- Awad, H., T.S. Barigah, E. Badel, H. Cochard and S. Herbette. 2010. Poplar vulnerability to xylem cavitation acclimates to drier soil conditions. *Physiol. Plant.* 139:280–288.
- Barigah, T.S., T. Ibrahim, A. Bogard, B. Faivre-Vuillin, L.A. Lagneau, P. Montpied and E. Dreyer. 2006. Irradiance-induced plasticity in the hydraulic properties of saplings of different temperate broad-leaved forest tree species. *Tree Physiol.* 26:1505–1516.
- Bazzaz, F.A. 1996. *Plants in changing environments*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bréda, N., R. Huc, A. Granier and E. Dreyer. 2006. Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. *Ann. For. Sci.* 63:625–644.
- Brodribb, T.J. and H. Cochard. 2009. Hydraulic failure defines the recovery and point of death in water-stressed conifers. *Plant Physiol.* 149:575–584.
- Choat, B., L. Sack and N.M. Holbrook. 2007. Diversity of hydraulic traits in nine *Cordia* species growing in tropical forests with contrasting precipitation. *New Phytol.* 175:686–698.
- Cochard, H. 2006. Cavitation in trees. *C. R. Physique* 7:1018–1026.
- Cochard, H., D. Lemoine and E. Dreyer. 1999. The effects of acclimation to sunlight on the xylem vulnerability to embolism in *Fagus sylvatica* L. *Plant Cell Environ.* 22:101–108.
- Cochard, H., G. Damour, C. Bodet, I. Tharwat, M. Poirier and T. Améglio. 2005. Evaluation of a new centrifuge technique for rapid generation of xylem vulnerability curves. *Physiol. Plant.* 124:410–418.
- Cochard, H., E. Casella and M. Mencuccini. 2007. Xylem vulnerability to cavitation varies among poplar and willow clones and correlates with yield. *Tree Physiol.* 27:1761–1767.
- Cochard, H., S.T. Barigah, M. Kleinhenz and A. Eshel. 2008. Is xylem cavitation resistance a relevant criterion for screening drought resistance among *Prunus* species? *J. Plant Physiol.* 165:917–922.
- Dreyfus, P. 2008. Dynamiques du Sapin, du Hêtre et des Pins dans l'arrière-pays méditerranéen: de la modélisation à l'aide à la gestion. Atelier REGEFOR 2007 - Forêts mélangées: quels scénarios pour l'avenir? *Rev. For. Fr.* 60:233–249.
- Fonti, P., G. von Arx, I. Garcia-Gonzalez, B. Eilmann, U. Sass-Klaassen, H. Gartner and D. Eckstein. 2010. Studying global change through investigation of the plastic responses of xylem anatomy in tree rings. *New Phytol.* 185:42–53.
- Fosaa, A.M. 2004. Biodiversity patterns of vascular plant species in mountain vegetation in the Faroe Islands. *Diver. Distrib.* 10:217–223.
- Froend, R. and P. Drake. 2007. Defining phreatophyte response to reduced water availability: preliminary investigations on the use of xylem cavitation vulnerability in *Banksia* woodland species. *Austr. J. Bot.* 54:173–179.
- García-Plazaola, J.I. and J.M. Becerril. 2000. Photoprotection mechanisms in European beech (*Fagus sylvatica* L.) seedlings from diverse climatic origins. *Trees Struct. Funct.* 14:339–343.
- Granier, A., E. Ceschia, C. Damesin, E. Dufrêne, D. Epron, P. Gross, E. Lebaube, V. Le Dantec, N. Le Goff, D. Lemoine, E. Lucot, J. Ottorini, J. Pontailler and B. Saugier. 2000. The carbon balance of a young Beech forest. *Funct. Ecol.* 14:312–325.
- Hacke, U. and J. Sauter. 1995. Vulnerability of xylem to embolism in relation to leaf water potential and stomatal conductance in *Fagus sylvatica*, *F. purpurea* and *Populus balsamifera*. *J. Exp. Bot.* 46:1177–1183.
- Hamrick, J.L. 2004. Response of forest trees to global environmental changes. *For. Ecol. Manag.* 197:323–335.
- Hukin, D., H. Cochard, E. Dreyer, D. Le Thiec and M.B. Bogeat-Triboulot. 2005. Cavitation vulnerability in roots and shoots: does *Populus euphratica* Oliv., a poplar from arid areas of Central Asia, differ from other poplar species? *J. Exp. Bot.* 56:2003–2010.
- Maherali, H., W.T. Pockman and R.B. Jackson. 2004. Adaptive variation in the vulnerability of woody plants to xylem cavitation. *Ecology* 85:2184–2199.
- Martinez-Vilalta, J., H. Cochard, M. Mencuccini, et al. 2009. Hydraulic adjustment of Scots pine across Europe. *New Phytol.* 184:353–364.
- Mayr, S., H. Cochard, T. Améglio and S.B. Kikuta. 2007. Embolism formation during freezing in the wood of *Picea abies*. *Plant Physiol.* 143:60–67.
- Nardini, A., S. Salleo, M. Lo Gullo and F. Pitt. 2000. Different responses to drought and freeze stress of *Quercus ilex* L. growing along a latitudinal gradient. *Plant Ecol.* 148:139–147.
- Nielsen, C.N. and F.V. Jorgensen. 2003. Phenology and diameter increment in seedlings of European beech (*Fagus sylvatica* L.) as affected by different soil water contents: variation between and within provenances. *For. Ecol. Manag.* 174:233–249.
- Pammenter, N. and C. Vander Willigen. 1998. A mathematical and statistical analysis of the curves illustrating vulnerability of xylem to cavitation. *Tree Physiol.* 18:589–593.
- Parelle, J., J.P. Roudaut and M. Ducrey. 2006. Light acclimation and photosynthetic response of beech (*Fagus sylvatica* L.) saplings under artificial shading or natural Mediterranean conditions. *Ann. For. Sci.* 63:257–266.
- Piboule, A., C. Collet, H. Frochot and J.F. Dhote. 2005. Reconstructing crown shape from stem diameter and tree position to supply light models. I. Algorithms and comparison of light simulations. *Ann. For. Sci.* 62:645–657.
- Pita, P., A. Gasco and J. Pardos. 2003. Xylem cavitation, leaf growth and leaf water potential in *Eucalyptus globulus* clones under well-watered and drought conditions. *Funct. Plant Biol.* 30:891–899.
- Pockman, W.T. and J.S. Sperry. 2000. Vulnerability to cavitation and the distribution of sonoran desert vegetation. *Am. J. Bot.* 87:1287–1299.
- Rahbek, C. 1995. The elevational gradient of species richness: a uniform pattern? *Ecography* 18:200–205.
- Rose, L., C. Leuschner, B. Köckemann and H. Buschmann. 2009. Are marginal beech (*Fagus sylvatica* L.) provenances a source for drought tolerant ecotypes? *Eur. J. For. Res.* 128:335–343.
- Sangsing, K., P. Kasemsap, S. Thanisawanyangkura, K. Sangkhasila, E. Gohet, P. Thaler and H. Cochard. 2004. Xylem embolism and stomatal regulation in two rubber clones (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Trees Struct. Funct.* 18:109–114.
- Sparks, J.P. and R.A. Black. 1999. Regulation of water loss in populations of *Populus trichocarpa*: the role of stomatal control in preventing xylem cavitation. *Tree Physiol.* 19:453–459.
- Sperry, J. and U. Hacke. 2002. Desert shrub water relations with respect to soil characteristics and plant functional type. *Funct. Ecol.* 16:367–378.
- Sperry, J. and N. Saliendra. 1994. Intra- and inter-plant variation in xylem cavitation in *Betula occidentalis*. *Plant Cell Environ.* 17:1233–1241.
- Stickán, W. and X. Zhang. 1992. Seasonal changes in CO₂ and H₂O gas exchange of young European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Trees Struct. Funct.* 6:96–102.

- Tyree, M. and F. Ewers. 1991. The hydraulic architecture of trees and other woody plants. *New Phytol.* 119:345–360.
- Tyree, M., H. Cochard, P. Cruiziat, B. Sinclair and T. Ameglio. 1993. Drought-induced leaf shedding in walnut – evidence for vulnerability segmentation. *Plant Cell Environ.* 16:879–882.
- Tyree, M., S. Davis and H. Cochard. 1994. Biophysical perspectives of xylem evolution: is there a tradeoff of hydraulic efficiency for vulnerability to dysfunction? *IAWA J.* 15:335–360.
- Tyree, M.T., B.M. Engelbrecht, G. Vargas and T.A. Kursar. 2003. Desiccation tolerance of five tropical seedlings in Panama. Relationship to a field assessment of drought performance. *Plant Physiol.* 132:1439–47.
- Vander Willigen, C. and N.W. Pammenter. 1998. Relationship between growth and xylem hydraulic characteristics of clones of *Eucalyptus* spp. at contrasting sites. *Tree Physiol.* 18:595–600.